

TARTU ÜLIKOOL

LOODUS - JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND

MOLEKULAAR - JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

RAKUBIOLOOGIA ÕPPETOOL

Kairi Koppel

***Forkhead 1* transkriptsioonifaktori kodeeriva ala deletsiooniplasmiidide  
konstrueerimine**

Bakalaureusetöö

Juhendaja *MSc* Allan Reinapae

TARTU 2015

SISUKORD	
KASUTATUD LÜHENDID .....	3
SISSEJUHATUS .....	5
1 KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	6
1.1 Rakutsükkel .....	6
1.2 Replikatsiooni alguspunktid .....	6
1.3 Pre-replikatsiooni kompleks .....	8
1.4 Replikatsiooni aktivatsioon.....	9
1.4.1 CDK ja DDK kinaasid .....	9
1.4.2 GINS ja CMG kompleks .....	11
1.5 Re-replikatsiooni inhibeerimine .....	11
1.6 Replikatsioonipunktide aktiveerumise ajastus.....	13
1.7 Kromatiini mõju replikatsiooni alguspunktide ajastusele.....	14
1.8 Replikatsiooni limiteerivad faktorid .....	15
1.9 Fkh transkriptsioonifaktorid .....	16
2 EKSPERIMENTAALNE OSA .....	18
2.1 Töö eesmärgid.....	18
2.2 Materjal ja metoodika .....	18
2.2.1 Tüved, plasmiidid ja söötmed.....	19
2.2.2 <i>Wild-type</i> plasmidi konstrueerimine .....	19
2.2.3 Deletsioonimutantide konstrueerimine.....	23
2.2.4 Sekveneerimine .....	25
2.2.5 Deletsiooniga ala amplifitseerimine pärmis transformeerimise jaoks .....	25
2.3 Tulemused ja arutelu.....	27
2.3.1 Overlap PCR protokollide optimeerimine.....	27
2.3.2 Metsiktüüpi plasmidi konstrueerimine .....	29
2.3.3 Deletsioonimutantide konstrueerimine.....	30
KOKKUVÕTE .....	32
SUMMARY .....	33
TÄNUAVALDUSED.....	34
KASUTATUD KIRJANDUSE LOETELU .....	35
LISAD .....	42

## KASUTATUD LÜHENDID

AAA+ - *ATPases Associated with diverse cellular activities*

Abf1- *ARS binding factor* (ARS-iga seonduv faktor)

ACS- *ARS consensus sequence* (autonoomselt replitseeruva kompleksi konsensusjärjestus)

APC/C- *Anaphase- promoting complex/cyclosome*

ARS- *Autonomously replicating sequence* (autonoomselt replitseeruv järjestus)

Cdc6- *Cell Division Cycle 6*

Dfb4- *DumbBell Forming 4*

CDK- *Cyclin-dependent kinase* (tsükliin-sõltuv kinaas)

Cdt1- *Chromatin licensing and DNA replication factor 1*

CMG- Cdc45-MCM-GINS kompleks

CKI- *Cyclin dependent kinase inhibitors* (tsükliin sõltuvate kinaaside inhibiitor)

Clb2/5/6- *B-type cyclins* (B-tüüpi tsükliinid)

Ctd1- *Chromatin licensing and DNA replication factor 1*

DBD- *DNA binding domain* (DNA-d seondav domään)

DDK- *Dbf4-dependent kinase* (Dfb4-sõltuv kinaas)

Dpb11- *DNA Polymerase B (II)*

DUE- *Double strand DNA unwinding element* (kaksikahela lahtikeramise element)

FHA- *Forkhead associated domain* (Forkheadiga seondumise domään)

Fhl1- *Forkhead-like 1*

Fkh1/2- Forkhead transkriptsioonifaktorid 1/2

FOX- *Forkhead box proteins*

GINS - Go-Ichi-Ni-San kompleks (Jaapani keeles 5,1,2,3)

Hcm1- *High copy supressor of calmodulin*

IGR- *Intergenic regions* (Intergeensed regioonid)

LB- Luria-Bertani

MCM2 – 7- *Minichromosome maintenance 2 – 7*

NDR- *Nucleosome depleted regions* (Nukleosoomide vaba piirkond)

ORC- *Origin Recognition Complex* (origin'i äratundev kompleks)

Pre-RC- *Pre-replication complex* (pre-replikatiivne kompleks)

SCF- *Skp1, Cullins, F-box proteins*

Sld2/3/5/7 - *Synthetically Lethal with Dpb11-1 2/3/5/7*

Wt - *Wild Type* (metsiktüüpi)

YPD - *yeast extract, peptone, dextrose* (pärmie ekstrakt, peptoon, dekstroos)

## SISSEJUHATUS

Selleks, et raku jagunemise käigus saaks mõlemale rakule võrdne koopia genoomist, on vajalik DNA vigadeta replitseerimine. See protsess on tugevalt konserveerunud kõikides rakkudes, valgud ja mehhanismid, mis seda läbi viivad on läbivalt sarnased nii prokarüootides kui eukarüootides.

DNA replikatsioon algab järjestustelt, mida nimetatakse *originideks*. Pagaripärmis on need defineeritud kui autonoomselt replitseeruvad järjestused ehk ARS-id. Genoomi ebastabiilsuse vältimiseks võib ühelt *originilt* toimuda replikatsioon vaid kord rakutsükli jooksul. Selle tagamiseks on rakkudel välja kujunenud mitmeid mehhanisme.

Ettevalmistused replikatsiooniks algavad vahetult peale DNA replikatsiooni, kui DNA-ga seonduvad kindlas järjekorras replikatsioonil osalevad valgud. Seda protsessi nimetatakse *originide* litsenseerimiseks, ning see leiab aset peamiselt G1 faasis, kui rakk valmistub raku jagunemiseks. Selle käigus laetakse DNA-le helikaasi valgud, millega võimaldatakse kaheaheelalise DNA lahti keeramine ja sünteesiks vajalike valkude seondumine DNA-le.

DNA litsenseerimine ja replikatsiooni initsieerimine hoitakse rakus ajaliselt lahus. Selle eest vastutavad mitmed faktorid, kuid peamine mehhanism on tagatud tsükliin sõltuvate kinaaside poolt. Nende ülesandeks on aktiveerida ning inaktiveerida replikatsioonil osalevaid valke. Just nende erinev tase erinevate rakutsükli ajal võimaldab hoida litsenseerimist ja initsieerimist üksteisest lahus.

Tulenevalt eukarüootide suurest genoomist on neil evolutsioonis välja kujunenud mehhanism, kus DNA replikatsioon algab mitmetelt *originidelt* korraga. Ebastabiilsuste vältimiseks pole see protsess juhuslik, ning erinevate *originide* aktivatsioon on ajaliselt täpselt reguleeritud. Kuna teadmised mehhanismidest, mis selle eest vastutavad jäävad veel ebaselgeks, on praeguseks siiski teada, et sellesse panustavad nii *originide* erinev affiinsus transkriptsioonifaktorite suhtes kui ka tuumasisene paigutus.

Aastal 2012 näidati, et olulist rolli *originide* ajastusele omavad globaalsed *Forkhead* Fkh1 ja Fkh2 transkriptsioonifaktorid. Katsetega näidati nende osalust nii varaste kui hiliste *originide* regulatsioonis. Käesoleva töö eesmärgiks oli Fkh1 kodeeriva ala deletsioonimutantide konstrueerimine, mis võimaldaks tulevikus täpsemalt uurida selle valgu rolli replikatsiooni ajastuse regulatsioonis. Teoreetilises osas antakse ülevaade replikatsiooni mehhanismist ning kuidas see on reguleeritud ning eksperimentaalses osas kirjeldatakse deletsioonimutantide konstrueerimist kasutades uut *Overlap* PCR kloneerimise meetodit.

# 1 KIRJANDUSE ÜLEVAADE

## 1.1 Rakutsükkel

Rakujagunemine ja replikatsioon on rangelt kontrollitud protsessid, mis on üheks baas-aluseks kõikide organismide arengule. Rakujagunemise eelduseks on kontrollitud rakutsükkel ja kõige selle eesmärgiks on anda tütarakkudele edasi terviklik koopia raku genoomist. Mõningate eranditega, suurem osa organismidest replitseerib kogu oma genoomi ühe rakutsükli jooksul. Lookuste re-replikatsioon ühe rakutsükli käigus võib viia genoomi ebastabiilsuseni ja seeläbi arengudefektide või raku surmani. Selle vältimiseks on organismidel välja kujunenud mitmed valk-komplekside poolt läbi viidavad kontrollpunktid, mis kindlustavad DNA- replikatsiooni toimumise rakutsükli S faasis. (Enserink, 2011)

Rakutsükkel on enamasti jagatud nelja faasi – G1 faas, mille käigus toimub raku kasv ja valmistumine rakujagunemiseks, S faas mille käigus toimub DNA- replikatsioon, G2 faas kus rakk valmistub M faasiks ja M faas, kus toimub kromosoomide segregatsioon tütarakkudesse ja rakujagunemine. Pagaripärmi *Saccharomyces Cerevsiae* iseloomustab küllaltki pikk G2 faas ja lühike G1 faas. (Diffley, 2004)

Rakutsükli progresseerumise aluseks on tagasiside regulatsiooni süsteemid, võimaldades järgmisesse rakutsükli faasi sisenemist kontrollida *on/off* lüliti printsiibi sarnaselt. On oluline, et kromosoomide segregatsioon ei toimuks enne, kui DNA replikatsioon on lõpuni viidud. Selleks on segregatsioon ja replikatsioon üksteisest ajaliselt eraldatud, vastavalt M faasi ja S faasi. (Murray ja Krischner 1989)

Ka mitmed genoomse DNA replikatsioonil osalevad valgud on kasutatavad replikatsiooniks vaid kindlas rakutsükli faasis. G2 ja M faasis transkribeeritakse geenid, mis osalevad replikatsiooni varastel etappidel nii, et nende tase on kõrgeim G1 faasis, nagu MCM 2 – 7(*Minichromosome maintenance*). Hilisemad geenid transkribeeritakse nii, et nende tase oleks kõrgeim S- faasis, DNA replikatsiooni ajal, nagu näiteks CDK-d. See on üks regulatsioonimehhanismidest, millega kindlustatakse replikatsiooni toimumine S- faasis. (Enserink ja Kolodner 2010)

## 1.2 Replikatsiooni alguspunktid

Replikatsioon toimub rakutsükli S faasis. Genoomi kahekordistamist alustatakse pagaripärmis kindlatelt genoomi järjestustelt, mida nimetatakse replikatsiooni *originideks*. Lihtsamad organismid nagu bakterid ja viirused kasutavad ainult ühte *origini*, samas

eukarüootides on *origine* tulenevalt nende suurest genoomist kuni kümneid tuhandeid. See võimaldab läbida rakul S-faas optimaalse ajaga, et kindlustada kogu genoomi duplitseerimine ühe rakutsükli jooksul (Kawakami ja Katayama, 2010; Gilbert 1998).

Pagaripärmis *Saccharomyces Cerevisiae* algab DNA replikatsioon *originidelt*, mida nimetatakse ka ARS-ideks (*Autonomously Replicating Sequences*). Pagaripärmis identifitseeriti ARS-id nende omaduse alusel toetada palsmiidide ja mini-kromosoomide replikatsiooni (Stinchcomb, Struhl jt., 1979). ARS-id on keskmiselt 100 – 200 aluspaari pikkused järjestused, sisaldavad mittekonserveerunud ARS konsensusjärjestust ACS (*ARS consensus sequence*) ehk A elementi. ACS-i defineeritakse 11 aluspaari pikkuse järjestuse alusel: (T/A)TTTAT(A/G)TTT(T/A) (Theis ja Newlon, 1994). Lisaks sisaldab ARS mitmeid vähemolulisi „B“ sekundaarelemente- B1, B2 ja B3 (Shirahige jt, 1993; Weinreich jt, 2004).

Pagari pärmi genoom sisaldab ligikaudu 12 000 ACS motiivi, kuid umbes 400 on neist aktiivsed. Seega on A element kriitiline *origini* funktsioneerimiseks, kuid ei garanteeri replikatsiooni alustamist lookuselt. *Origini* aktiivsusesse panustavad lisaks ka B sekundaarelemendid (Lin ja Kowalski, 1997). B1 element suudab *origini* ära tundvat kompleksi ORC (*Origin Recognition Complex*) seondada olles sarnane ACS järjestusega (Bell ja Stillmann, 1992) B2 element sisaldab endas kaheahelalise DNA lahti keeramise elementi DUE (*Double strand DNA unwinding element*), millest algab DNA replikatsioon, ning see element on vajalik replikatsiooniks vajalike valkude seondumiseks (Wilmes ja Bell, 2002). B3 on 22 aluspaari pikkune lisaelement, ning ARS1 *originil* seondub sellega Abf1 (*Autonomously replicating sequence binding factor 1*) transkriptsioonifaktor (Marahrens ja Stillman, 1992). Pärmis leidub sadu *origine* ning kõik nad jagavad sarnast ACS järjestust ja originile omast kombinatsiooni B elementidest. (Nieduszynski jt., 2006) Mutatsioonid ACS järjestuses võivad viia ARS funktsiooni kadumisele, kuid ei pruugi, kuna ACS talub paari nukleotiidilisi erinevusi (Theis ja Newlon, 1997).

See, kas kindel ACS käitub kui *origin*, on määratud paljude faktorite poolt, näiteks kui kergesti harutatakse *origini* DNA üheaahelaliseks, B-elementiga seonduva transkriptsioonifaktori olemasolu, ümbritseva kromatiini konformatsioon. Eraldiseisvalt võib nendel omadustel olla *origini* aktiivsusele vähene mõju, kuid koos esinedes võivad nad määrata, kas ACS element käitub kui *origin* või mitte (Nieduszynski jt., 2006). Kokkuvõtvalt, *origini* funktsioneerimiseks on vajalik konsensussele vastav ACS järjestus, kuid see pole ainus *origini* funktsioneerimist määrav determinant. Sellesse võivad panustada ka mitmed teised

omadused, mis ei pruugi ühtida kõigi *originide* puhul ning võivad mõjutada nende selektsiooni, näiteks kromatiini struktuur või transkriptsiooniline aktiivsus (Mechali, 2010).

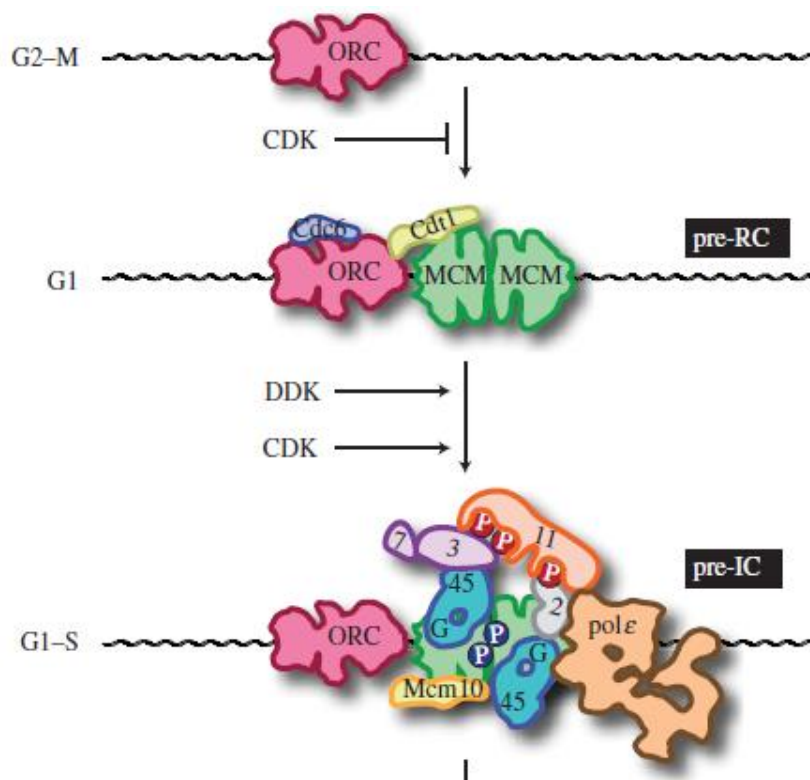
### 1.3 Pre-replikatsiooni kompleks

DNA replikatsioon on mitmeastmeline protsess, mis algab replikatsiooni originidele pre-replikatsiooni komplekside pre-RC (*pre-replication complex*) moodustumisega, ehk *originide* litsenseerimisega (Joonis 1). Esimesena seondub ORC valgukompleks A-T rikastele ACS järjestustele G2 – G1 faasis ning jääb sellega seotuks kuni S faasini. (Belsky jt., 2015) ORC kompleks koosneb kuuest Orc1 – 6 valgust. Subühikud on järjestatud vastavalt nende molekulmassile, suurimaks subühikuks on Orc1 ja väikseimaks Orc6. ORC sisaldab ATP-aasi domääni ja selle DNA-le seondumine on ATP- sõltuv. (Bell ja Stillmann, 1992) Rakus moodustab ORC kuuest subühikust koosneva heteroheksameeri ning seondub kõigi replikatsiooni *originidega* (Gibson jt., 2006). Viis esimest subühikut sisaldavad kõik AAA+ (*ATPases Associated with diverse cellular Activities*) domääni. Need subühikud on vajalikud DNA-ga seondumiseks, erandiks on Orc3, mis ei seonu otseselt DNA-ga. Pigem ühendab see teisi DNA-ga seonduvaid subühikuid. (Clarey jt., 2006) Orc6 on ainuke subühik, mis ei sisalda AAA+ domääni, ning ei seonu DNA-le. Selle ülesandeks on Cdt1-MCM2-7 dimeeride seondamine (Takara ja Bell, 2011). ORC kompleksi peamiseks ülesandeks on märgistada genoomil kõik lookused, millelt on võimalik replikatsiooni alustada.

ORC kompleksiga seondub järgnevalt Cdc6 (*Cell division cycle 6*), mis värbab *originile* Cdt1-st ja Mcm2-7-st koosneva kompleksi. Mcm2 - 7 koosneb kuuest tugevalt konserveerunud subühikust, mille C- terminuses asub ATP-aasi domään. Mcm2 - 7 loetakse replikaatiivseks helikaasiks, seda toetab ka fakt, et pagaripärmis on näidatud, et Mcm2 - 7 subühikud jäävad replikatsioonikahvliga seotuks ka peale replikatsiooni alustamist, viidates Mcm 2 – 7 rollile nii initsiatsioonil kui elongatsioonil (Aparicio jt., 1997). Aktiveerimiseks valmis olev origin sisaldab topeltheksameerset Mcm2-7 kompleksi. Originile teise Mcm2-7 laadimiseks on vajalik Cdt1 (chromatin licensing and DNA replication factor 1) dissotsieerumine, mis toimub Cdc6 vahendatud ATP hüdrolyüsi tulemusena (Sun jt, 2014).

Topelt heksameerne helikaas seondub märkimisväärselt tugevamalt: kui topeltheksameer ei ole eemaldatav originilt, siis üksik Mcm2-7 on tugeva soolalahusega maha pestav (Coster jt., 2014). Pre-RC moodustamine on lõpuni viidud, kui originile on laetud ORC, Cdc6 ja topelt heksameerne Mcm2-7 kompleks ning origin jääb ootama G1 ja S faasi vahelist aktivatsiooni.





**Joonis 1 Pre-replikatiivse kompleksi kokkupanek.** Numbritele vastavad valkude nimed: 11, Dpb11; 3- Sld3; 7- Sld7; 2- Sld2; G- GINS; 45, Cdc45. Tsükliin-sõltuva kinaasi CDK fosforüleerimised on toodud punaselt, Dfb4-sõltuva kinaasi DDK fosforüleerimised on toodud siniselt. Pre-replikatiivse kompleksi kokkupanek algab ORC kompleksi seondumisega originidele. ORC kompleksiga seondub Cdc6, millega omakorda seondub Cdt1- MCM2-7 dimeer. Moodustunud kompleksi aktiveerimine algab Mcm2-7 subühikute fosforüleerimisega DDK poolt, mis tõstab helikaasi afiinsust Cdc45 ja GINS kompleksi suhtes. Nende kahe valgu seandumine nõuab veel CDK poolt fosforüleeritud Sld2, Sld3 ning Dpb11 faktorite osalust. MCM2-7 –Cdc45 – GINS kompleksi interaktsiooni tulemusel tekib originidele CMG kompleks, mis kätub kui helikaas, ning võimaldab DNA lahti keeramist, et DNA polümeraas saaks DNA-le seonduda. (Diffley, 2011)

## 1.4 Replikatsiooni aktivatsioon

### 1.4.1 CDK ja DDK kinaasid

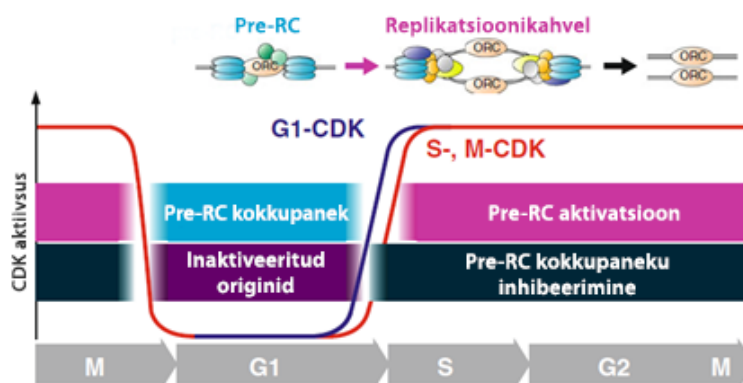
#### 1.4.1.1 Tsükliin-sõltuvad kinaasid

Kinaaside mehhaaniline roll on enamasti sihtmärk valkude fosforüleerimisega kutsuda esile konformatsiooniline muutus sihtmärk valgus. Pagaripärmis on CDK oluline (*cyclin dependent*

*kianse*) rakutsükli, DNA replikatsiooni initsiatsiooni ning re-replikatsiooni takistamisel. Pärmis rakutsükli reguleerimiseks on kinaasidest vajalik ainult CDK1, kõrgemates eukarüootides on vajalik lisaks ka CDK 2, 4 ja 6 osalus (Malumbres ja Barbacid 2009).

CDK aktiveeriva dimerisatsiooni partneri Clb5, Clb6 (*B-type cyclins*) kontsentratsiooni tõustes G1/S faasi üleminekul suureneb CDK katalüütiline aktiivsus (Joonis 2) (Zegerman ja Diffley, 2007). Kuna kinaas tohib olla aktiivne ainult väikeses ajavahemikus on CDK aktiivsus inhibeeritud mitmete erinevate mehhanismidega. G1 faasi vältel on nad inaktiivsed tulenevalt madalast tsükliinide kontsentratsioonist (Pines, 1994). Teiseks on CDK aktiivsus negatiivselt reguleeritud läbi tsükliin-sõltuvate kinaaside inhibiitorite CKI (*Cyclin dependent kinase inhibitors*), mis seonduvad otse tsükliin-CDK kompleksidele ja inhibeervad ATP seondumist kinaasile või hoiavad ära tsükliinide seondumist (Paveltich, 1999).

Sld2 ja Sld3 fosforüleerimine G1/S faasi üleminekul on kriitiline pr-RC-de aktivatsiooniks. Fosforüleerituna seonduvad need faktorid Dpb11- ja Cdc45-ga, mis on hädavajalik protsess funktsionaalse replisoomi moodustumiseks. (Kamimura jt., 2001) *Origini* aktiveerimisel Sld2 ja Sld3 koos Sld11-ga eemaldatakse kokku pandavalt replisoomilt üheaahelalise DNA tekitamise tagajärjel. (Bruck ja Kaplan, 2014a, 2014b; Dhingra, jt 2015)



**Joonis 2 CDK aktiivsus läbi rakutsükli.** G1 faasis on CDK-d inaktiivsed ja *originide* aktiveerimist ei toimu. G1 faasi lõpus hakkab aga CDK tase tõusma, ning S-faasis CDK-d aktiveeritakse, mis võimaldab *originidele* moodustunud pre-replikatiivse kompleksi aktiveerimist, mille tulemusena moodustub 2 vastassuunda liikuvat replikatsioonikahvli. (Araki 2009)

#### 1.4.1.2 Dfb4- sõltuv kinaas

Sarnaselt CDK-le osaleb ka DDK (*Dfb4-dependent kinase*) replikatsiooni initsiatsioonil. DDK on aktiivne ainult S faasis, kuna Dfb4 on ekspresseeritud ainult hilises G1 faasis (Tanaka ja Araki, 2010). Dfb4 (*DumbBell Forming 4*) stabiliseeritakse G1/S faasi üleminekul, kuna aktiivne on ka CDK1. See inaktiveerib fosforüleerides APC/C (*Anaphase- promoting*

*complex/cyclosome*) kompleksi, mis aktiivsena degradeerib Dfb4-ja (Jaspersen, Charles jt., 1999; Ostapenko, Burton jt., 2008). DDK ülesandeks on mitmete Mcm2 – 7 subühikute fosforüleerimine. In vitro on näidatud subühikute 2, 3, 4, 6 ja 7 fosforüleerimist ning see soodustab Mcm2-7 kompleksi seondumist teiste replikatsioonivalkudega nagu näiteks Cdc45 ja GINS kompleks (*Go-Ichi-Ni-San*, jaapani keeles). (Weinreich ja Stillmann 1999; Sheu ja Stillmann, 2010). Kuigi ei ole teada kõikide Mcm2 – 7 subühikute fosforüleerimiste funktsioone on tehtud siiski mõningaid silmapaistvaid edusamme selles vallas. Näiteks Bruck (2015) demonstreeris, et DDK põhjustatud Mcm2 subühiku fosforüleerimine kaotab Mcm2 ja Mcm5 vahelise interaktsiooni, mis võimaldab kaheaahelalist DNA-d ümbritsevast Mcm2 – 7 kompleksist üheaahelalisel DNA-l väljua (Bruck ja Kaplan, 2014). Selliselt sai vastuse replikatsiooni uurivaid teadlasi pikalt vaevanud küsimus: kuidas pääseb DNA suletud helikaasi sisemusest välja?

#### 1.4.2 GINS ja CMG kompleks

GINS kompleks tuuakse *originidele* vahetult enne Pe-RC-de aktiveerimist, ning on vajalik Mcm ja Cdc45 vahelise kontakti stabiliseerimisel (Gambus jt., 2006). Kirjeldatud värbamist teostab DDK kinaas, mis fosforüülib Mcm2-7 kompleksi erinevaid subühikuid. Tulemusena suureneb replikatiivse helikaasi affiinsus Cdc45 ja GINS kompleksi suhtes. See viib CMG (*Cdc45 – Mcm2-7 – GINS*) kompleksi moodustumisele, millel on suurem helikaasne aktiivsus kui Mcm2 – 7 kompleksil üksi ning see käitub kui DNA replikatiivne helikaas (Ilves jt., 2010).

ARS-i aktivatsiooni tulemusena moodustuvad *originile* kaks vastassuunda liikuvat replikatsioonikahvlit, kaksikahelaline DNA keeratakse lahti ning polümeraasi DNA-le laadimisele järgneb süntees (Walter ja Araki, 2006).

#### 1.5 Re-replikatsiooni inhibeerimine

Kogu genoomi kõik lookused peavad S faasis replitseeruma ning seda mitte vähem ega rohkem kui täpselt üks kord. Kõrvalekalded eeltoodust võivad viia genoomi ebastabiilsuse ja vähini (Gondor ja Ohlsson, 2009). CDK-d suudavad fosforüleerida kõiki pre-RC komponente selleks, et takistada ORC, Cdc6, Cdt1, Mcm2-7 ja DNA vahelist interaktsiooni pärssides sellega re-replikatsiooni toimumist (Joonis 3) (Nguyen, Co jt., 2001). CDK-d reaktiveeritakse G1/S faasi üleminekul (Joonis 2) ja sellepärast on S faasis juba replitseeritud origini relitsenseerimine pärsitud. (Diffley, 2011). Seega on CDK-l oluline roll limiteerida

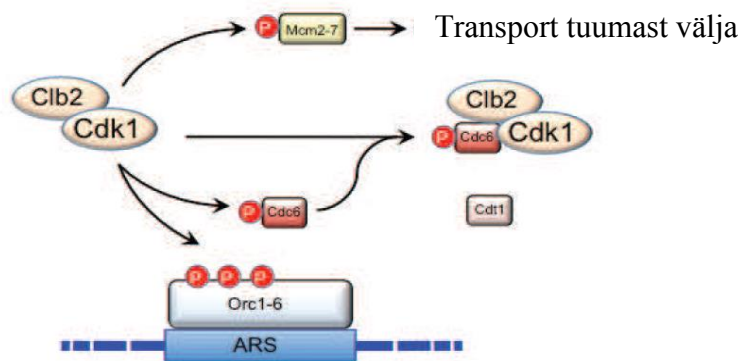
replikatsiooni toimumine kord rakutsükliks. Ebakorrektnel CDK1 regulatsioon võib põhjustada DNA replikatsiooni häireid ja genoomi ebastabiilsust (Gondor ja Ohlsson, 2009).

CDK1 fosforüleerib ORC kompleksi ja Cdt1-te, mille tulemusel ei moodustu nendevahelist kompleksi. Cdt 1 on oluline MCM2-7 DNA-le laadimisel. Selle pärssimine katkestab *originide* litsenseerimise ja edasine replikatsioonikompleksi kokkupanek on katkestatud (Nguyen, Co jt., 2001; Chen ja Bell, 2011).

Cdc6 on inhibeeritud kolmel erineval tasemel. Esiteks Cdc6 transkriptsioon on limiteeritud G1-S faasi (Moll, Tebb jt., 1991). Teiseks, CDK1 poolne Cdc6 fosforüleerimine muudab selle SCF (*Skp1, Cullins, F-box proteins*) poolse degradeerimise sihtmärgiks (Dury, Perkins jt., 1997). Kolmandaks fosforüleeritakse järgi jäänud Cdc6 Cdk1 poolt, mis indutseerib selle seondumist Clb2 – CDK1 kompleksiga ja seeläbi takistab Cdc6 poolset ORC kompleksiga seondumist ja *originide* litsenseerimist (Mimura, Seki jt., 2004). Mitoosi lõpus degradeeritakse Clb2 APC/C poolt ning Cdc6 funktsioon taastub (Wäsch ja Cross, 2002).

Kuigi Cdc6 seotud mehhanismid on efektiivsed, leidub veel teisigi mehhanisme. Kuni S faasi sisenemiseni hoitakse Mcm2-7 kompleks inaktiivsena. Vaba Mcm2-7 on rakus seotud Cdt1-ga ning Cdt1 puudumisel ei liigu Mcm2-7 G1 faasis tuuma. Sarnaselt ei kogune Cdt1 tuuma kui puudub Mcm2-7 (Tanaka ja Diffley, 2002). Mcm2-7 kompleks ja Cdt1 viiakse ka CDK1 vahendusel tuumast välja, vältimaks nende ligipääsu kromosomaalsele DNA-le (Labib, Diffey jt., 1999; Nguyen, Co jt., 2000; Liku., Nguyen jt., 2005)

Kõrgemates eukarüootides, spetsiifiliselt hulkraksetes, on kirjeldatud ka Geminiini poolset Cdt1 funktsiooni inhibeerimist, kus see takistab *originide* litsenseerimist (Remus ja Diffley 2009). Geminiin on APC/C substraat, ning kuna APC on aktiivne mitoosis ja G1 faasis, on geminiin samal ajal inaktiveeritud. Sellega võimaldatakse Cdt1-l *originide* litsenseerimist (Karamitros jt., 2010).



**Joonis 3 Re-replikatsiooni takistamise mehhanismid.** Clb2 - CDK1 inhibeerib Orc ja Cdc6 seondumist Orc kompleksiga nende fosforüleerimise kaudu. Fosforüleeritud Cdc6 seondub Clb2 – Cdk1 kompleksiga. Mcm2-7 fosforüleerimine suunab selle tuumast välja. (Enserink 2011)

## 1.6 Replikatsioonipunktide aktiveerumise ajastus

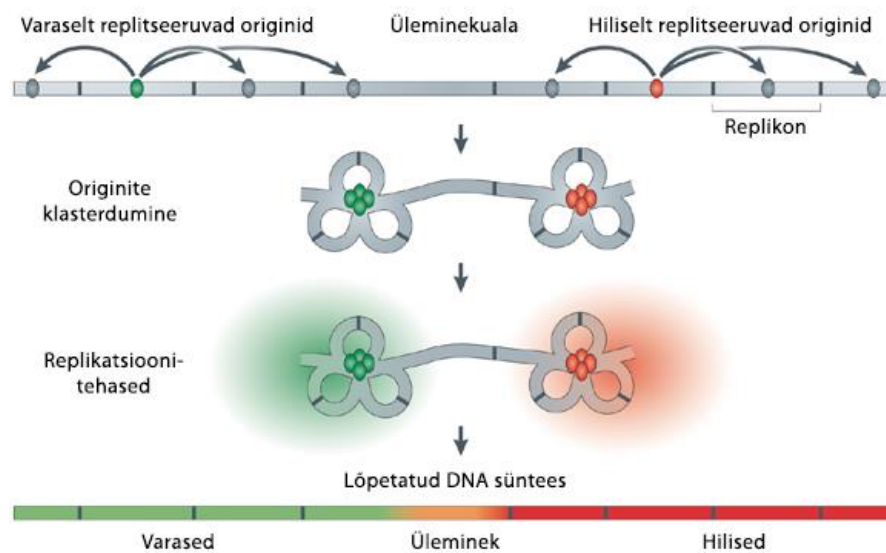
Kõik *originid* ei alusta replikatsiooni S-faasis üheaegselt, vaid originite aktiveerimine on jaotatud kogu S faasi aja-spektri peale. Origini aktiveerumise aja, varane või hiline S faas, alusel klassifitseeritakse origine varajasteks ja hilisteks. Samuti ei alustata *originidelt* replikatsiooni iga rakutsükli ajal. Efektiivsus kirjeldab, kui tihti toimub antud *originilt* initsiatsioon (Kalejta ja Hamlin, 1996). Efektiivsus ja ajastus on seotud nii, et varasemad ja efektiivsemad *originid* replitseerivad passiivselt ka lähedal asuvad hilised *originid* seega leidub korrelatsioon varaselt replitseerumise ja efektiivsuse vahel (Yang jt., 2010).

Teaduskirjanduses on viiteid mis näitavad, et originite ajastus määratakse enne S faasi. Belsky (2015) näitas, et originite grupp, mis suudab seondada ORC kompleksi juba G2 faasis on keskmiselt varasem, kui grupp origine mis seovad ORC-i ainult G1 faasis. (Belsky jt., 2014). Ei ole täpselt teada kuidas reguleeritakse originite aktivatsiooni ajalast programmi, kuid erinevate mehhanismide ühine omadus on, et reguleeritakse replikatsiooniks vajalike valkude ligipääsu, nt epigeneetilised modifikatsioonid, kromosoomi- ja tuumasisene asetus ning kromosoomikontekst (Soriano jt., 2014).

Replikatsioon on reguleeritud suurte kromosoomi domäänide tasandil, imetaja rakkudes on nendeks 100- 200 kilobaasised järjestused. (Berezney jt., 2000). Nende järjestuste siseselt koonduvad järjestikku asetsevad varaselt replitseeruvad *originid* klastrisse, nagu ka hilised *originid*, ning selle tulemusel moodustub mitmeid replisoomi sisaldav replikatsioonitehas. Varasemalt usuti, et repikatsioonitehased sisaldavad kuni 20 replisoomi (Kitamura jt, 2006)

kuid 2013 avaldatud uurimus *Saccharomyces Cerevisiae* peal (Saner jt., 2013) tõi sellesse arusaama palju detailsema pildi.

Autorid kasutasid ühe raku reaajas pildistamise (*Live-cell imaging*) meetodit ning uuriti, kui tihti saavad kõrvuti seisvad replisoomid replikatsioonitehasteks kokku. Oma tulemustes tõid nad välja, et replikatsioonitehaste suurus varieerub rakkudes suuresti, ning 39% neist (Saner, jt 2013) sisaldab vaid ühte replisoomi. Rohkem replisoomi sisaldavad replikatsioonitehased on vähem levinud. Ülegenoomse matemaatilise mudeliga näidati, et sama tihti kui Saner (2013) mõõtis, satuvad kõrvuti olevad replisoomid kokku juhuslikult. Seega ei ole määravat faktorit kumba replikatsiooni tehasesse replisoom kuulub, kas temast vasemale või paremale jäävasse tehasesse (Joonis 4). (Saner jt., 2013)



**Joonis 4. Replikatsioonitehaste moodustumine.** Individuaalsesse replikatsioonitehastesse koondatakse lähedal asetsevad varased või hilised *originid*, millega võimaldatakse suurte DNA domäänide replitseerumist ning ligipääsu replikatsioonifaktoritele. (Gondor ja Ohlsson, 2009)

### 1.7 Kromatiini mõju replikatsiooni alguspunktide ajastusele

Replikatsiooni ajastus korreleerub tihti geenide aktiivsuse ning kromatiini struktuuriga. Transkriptsiooniliselt aktiivne eukromatiin replitseerub S-faasi esimeses pooles ning vaigistatud heterokromatiin replitseerub faasi teises pooles. Näiteks pagaripärmis replitseerub ARS609 subtelomeerses heterokromatiinses alas S faasi lõpus ja ARS605 subtsentromeerses eukromatiinses alas varajases S faasis (Lööke jt., 2013). Praeguseks on statistiliselt tõestatud korrelatsioon transkriptsiooni ja varase replikatsiooni vahel (Schubeler, 2002), kuid

arvatavasti on replikatsioon ennekoike seotud kromatiini ligipääsetavusega ja tuumasisese asetusega (Gilbert 2002, 2001; Hiratani jt., 2008).

Üks uuritumaid kromatiini modifikatsioone on histoonide atsetüleeritus, mida seostatakse tavaliselt transkriptsiooniliselt aktiivsete piirkondadega. Lisaks on näidatud, et atsetüleerimine võib muuta *originide* aktiveerimise ajalist järjekorda. Varajaseks replikatsiooniks on vajalik atsetüleeritud histoonide olemasolu *originil*, mille tulemusena on kromatiin avatuma konformatsiooniga ja võimaldab transkriptsioonifaktorite kergemat ligipääsu, samas hiline replikatsioon on enamasti seotud atsetüleerimise puudumisega. (Goren, 2008; Vogelauer jt., 2002)

Pagari pärmi replikatsiooni *origine* iseloomustab nukleosoomivaba NDR (*Nucleosome depleted regions*), mis kattub osaliselt ACS elemendiga (Eaton jt., 2010) ning paiknemine intergeensetes regioonides IGR (*Intergenomic regions*). On leitud, et hilisemad *originid* paiknevad konvergentsetes IGR-ides. Lisaks on teada, et varasemaid *origine* iseloomustab laiem NDR. Välja on pakutud hüpotees, mille kohaselt transkriptsioonifaktorite erinev afiinsus varajaste ja hiliste *originide* suhtes tuleneb nende erinevast *origin*i ehitusest. Näiteks on transkriptsioonifaktoritel tugevam affiinsus laiemal NDR-iga *originide* suhtes. (Soriano, 2014) Sellest tulenevalt seonduvadki transkriptsioonifaktorid eelistatult ja tugevama affiinsusega nendele *originidele*, defineerides neid kui varaseid *origine*.

## 1.8 Replikatsiooni limiteerivad faktorid

Cdc45 ja Sld3 ekspresseeritakse vähesel määral kogu rakutsükli vältel. Seetõttu on nad replikatsioonis limiteerivaks faktoriks. See on ka leidnud eksperimentaalset kinnitust, kui teostati Cdc45 üle-ekspressioon, mille tulemusel hilised *originid* alustasid replikatsiooni varem kui metsiktüüpi kontrolli puhul (Tanaka jt., 2011; Mantiero jt., 2011). Sld3 koopianumber rakus on umbes 3,2 korda väiksem kui *originide* arv. Sellest tulenevalt taaskasutatakse varastelt *originitelt* vabanenud Cdc45 ja Sld3 hilistel *originidel* (Ghaemmaghami jt., 2003; Wyrick jt., 2001; Yabuki jt., 2002)

Limiteerivate faktorite konkureeriv seondumine ja taaskasutus võimaldab kontrollida *origin*i aktiveerimise aega- varajased *originid* seonduvad eelistatult Sld-2 - Sld3 - Sld7 - Cdc45-ga ning selle taga usutakse olevat seondumist soodustav kromatiini struktuur (Tanaka jt., 2011; Soriano, 2014; Araki, 2010).

## 1.9 Fkh transkriptsioonifaktorid

*Forkhead (FOX)* perekonna transkriptsioonifaktorid omavad eukarüootsetes rakkudes mitut rolli. Selle perekonna valgud seonduvad nukleiinhapetele monomeerina neile omase DNA-d seondava domääni DBD (*Forkhead DNA-Binding Domain Fkh*) kaudu. Pagaripärmis seondub see domään konserveerunud genoomsele DNA järjestusele RYMAAYA (R=A/G, Y=C/T, M=A/C). (Tuteja jt., 2007)

Imetajates on FOX perekonna transkriptsioonifaktoreid kirjeldatud kui valke, mis osalevad rakutsükli regulatsioonis, organismi arengus, vananemisel ja apoptoosis ning suudavad modifitseerida kromatiini, muutes seda avatumaks ning mõjutades sel viisil geenide aktiivsust ja transkriptsioonifaktorite seondumist. (Lalmansingh AS jt, 2012)

Pagaripärmis *Saccharomyces cerevisiae* leidub neli FOX perekonna faktorit, mis sisaldavad Fkh-DBD domääni, Fkh1 (*Forkhead homolog 1*), Fkh2 (*Forkhead homolog 2*), Hcm1 (*High copy supressor of calmodulin*) ja Fhl1 (*Forkhead-like 1*) (Murakami jt, 2010). Fkh1 ja Fkh2 on neist enim sarnasemad ning tunnevad ära samu DNA järjestusi. Fkh1 ja Fkh2 omavad mõlemad FHA domääni (*Forkhead associated domain*), millega Fkh1/2 seondub teiste valkudega (Kumar jt., 2000; Simon jt., 2001).

Viimase kolme aastaga on selgelt näidatud *Forkhead* transkriptsioonifaktorite osalust replikatsiooni alguspunktide aktivatsiooni ajastuse reguleerimisel. Transkriptsioonifaktorid Fkh1 ja Fkh2 mõjutavad pagaripärmis *origini* aktiveerimise ajastust ligi pooltel *originidel*, nii varajaseid kui hiliseid. (Knott, 2012) Katsed selgitada Fkh1/2 toimimise mehhanismi replikatsioonis on näidatud, et Cdc45 seundumine G1 faasis võib olla soodustatud Fkh1/Fkh2 seundumisega *originile*. Lisaks on näidatud, et Fkh1 suudab kaks lookust erinevatel kromosoomidel siduda tuumas ühte asukohta. Seda nähti kasutades 4C (*chromosome conformation capture-on-chip*) meetodit ning näidati, et ARS305 ja ARS607 asetsevad lähestikku metsiktüüpi rakkudes ning interaktsioon ei olnud täheldatav kui ühel neist eemaldati *Fkh1/2* konsensus järjestus. See viitab Fkh1/2 valkude võimekusele tekitada kontakt kahe lookuse vahel mis asetsevad eraldi kromosoomidel. (Knott jt, 2012; Ostrow, 2014).

Teaduskirjanduses esimene ja viimane välja pakutud Fkh1/2 toime-mehhanism on: genoomis eraldi asetsevad varased *originid* koondatakse Fkh1/2 vahendusel klastritesse, kus on replikatsiooniks limiteerivaid faktoreid suuremas kontsentratsioonis kui klastirvälisel alal. Praeguseks on näidatud, et Fkh1/2 poolt reguleeritavad *originid* asuvad kõrvuti, moodustades



nii Fkh1/2 poolt reguleeritud lookuste klastreid. Statistiline analüüs näitab, et selline Fkh1/2 poolt reguleeritavate originite kondenseerumine ei ole seletatav juhusliku kõrvutamisega, mis viitab evolutsiooni käigus kujunenud rollile. Autorid postuleerisid, et Fkh1 ja Fkh2 reguleerib replikatsiooni ajastust läbi Fkh-aktiveeritavate saitide klastritesse koondamise, kus on teadmata mehhanismidega soodustatud ligipääs Cdc45-le. Selline saitide ja initsiatsioonifaktorite kontsentreerimine võimaldab kineetilist eelist replisoomide assambleerimiseks, mida vajatakse S-faasi sisenedes replikatsiooni alustamiseks. Välja käidud mudeli kohaselt muudab see need klastrid varajasteks replikatsioonitehasteks. (Knott jt, 2012)

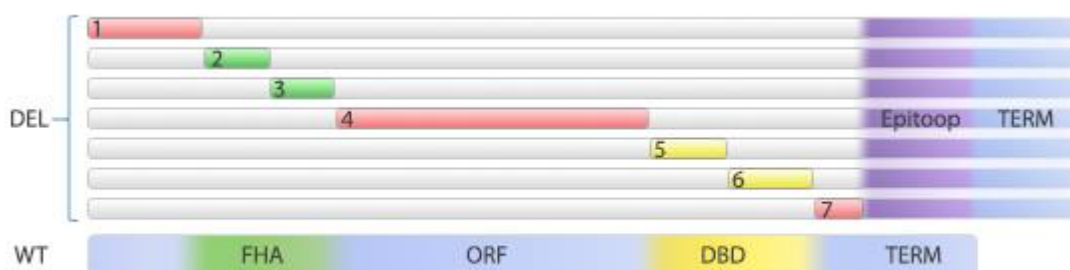
Hetkel on aga ebaselge Fkh1 valgu piirkond, mis on oluline Fkh1rolliks replikatsioonis. Lisaks ei ole ka teada, mis valkudega peab Fkh1 interakteeruma, et omada mõju replikatsiooni alguspunktide ajastusele.

## 2 EKSPERIMENTAALNE OSA

### 2.1 Töö eesmärgid

Käesoleva töö eesmärk:

- Leida optimaalne *Overlap* PCR protokoll, mis võimaldaks plasmiidi sisestada kuni 2000 aluspaari pikkuseid järjestusi.
- Konstrueerida plasmiid, mis kodeerib epitoop märgisega Fkh1-te ning tema metsiktüüpi promootor ja terminaator alasid.
- Viia Fkh1 kodeerivasse alasse 7 erinevat deletsiooni (Joonis 5), mida saab kasutada järgnevates töödes Fkh1 transkriptsioonifaktori iseloomustamisel.



**Joonis 5 Konstrueeritavad deletsiooniga plasmiidid.** *Forkhead*'iga seondumise domään *FHA*, DNA-d seondav järjestus *DBD*, epitoop, Fkh1 kodeeriv järjestus *ORF*, terminaatorjärjestus *TERM*. Halliga on toodud Fkh1 kodeeriv ala, ning punase, rohelse ja kollasega on märgitud deleteeritavad piirkonnad. Deletsiooniga plasmiidides on enne terminaatorjärjestust epitoop. Kokku tehakse 7 erinevat deletsiooni. (Autor)

### 2.2 Materjal ja meetodika

Selleks, et teha deletsioonimutante oli vajalik Metsik-tüüpi (*Wild-type* WT) plasmiidi konstrueerimine, mis sisaldaks nii promootorit + kodeerivat ala, epitoopi ning terminaatorjärjestust. Selleks amplifitseeriti praimeritega pagaripärmi genoomselt DNA-lt Fkh1 promootor ja kodeeriv ala *ORF* (*Open reading frame*). Seejärel sisestati *ORF Overlap* PCR (*Overlap polymerase chain reaction*) (Lisa 1) reaktsiooniga. Järgides samu juhiseid amplifitseeriti ja sisestati plasmiidi terminaatorpiirkond.

Kõik tööde läbi viimiseks kasutatud kommertsiaalsete ensüümide, lahuste ning teiste töövahendite loetelu on toodud koos tootjate ning tootjapoolsete nimetustega lisa 2.

## 2.2.1 Tüved, plasmiidid ja söötmed

Pagaripärmi genoomne DNA eraldati tüvest AKY153 (leu2-3,112 trp1-1 can1-100 ura3-1 ade2-1 his3-11,15). *Saccharomyces cerevisiae* kolooniaid kasvatati 30 °C juures YPD (**E**ast **E**xtract **P**eptone) tardsöötmele [agar 20 g/l, glükoos 20 g/l, mükoloogiline peptoon 20 g/l (LAB MTM), pärmiekstrakt 10 g/l (LAB MTM)]. Plasmide transfekteeriti ja amplifitseeriti kompetssesse *E.coli* rakuliini DH5 $\alpha$ . *E.coli* rakke kasvatati ampenitsilliini (100  $\mu$ g/ml) sisaldavas LB (**L**uria **B**ertani) vedelsöötmes [trüptoon 10 g/l, pärmiekstrakt 5 g/l, NaCl 10 g/l] 37 °C juures 180 rpm loksutil 15 tundi. Transfekteerunud *E.coli* rakud kasvatati SOC (**S**uper **O**ptimal **B**roth) [trüptoon 20 g/l, pärmiekstrakt 5 g/l, NaCl 0,5 g/l, KCl 0,186 g/l, MgCl 0,952 g/l, glükoos 3,6 g/l] vedelsöötmes 1 tund ja tõsteti penitsilliini sisaldavale LB tassile. Soovitud plasmide sisaldavate *E.coli* rakkudega amplifitseeriti plasmimidi LB vedelsöötmes 37 °C juures üle öö. Töös kasutati plasmidi pBS-3x3F12-NATMX6.

## 2.2.2 Wild-type plasmidi konstrueerimine

### 2.2.2.1 Genoomse DNA eraldamine pärmist

Genoomse DNA eraldamiseks pärmist suspendeeriti üks pärmikoloonia 100  $\mu$ l 200 mM LiOAc ja 1% SDS lahuses ning inkubeeriti 10 minutit 70 °C juures termostaadis (*Eppendorf Thermomixer compact*). Järgnevalt sadestati rakupuru ja DNA tsentrifuugimisega (*Eppendorf Centrifuge R-5415*) 1 minut maksimumpööretel (16 100 G) ning supernatant aspireeriti. Sadet pesti 70% etanooliga ning sade lahustati 50  $\mu$ l TE puhvrts (Lisa 3). Järgnevalt puhastati eraldatud DNA standard etanool sadestamist kasutades.

### 2.2.2.2 DNA sadestamine

DNA puhastamiseks ja sadestamiseks lisati sadestatavale DNA-le 2  $\mu$ l glükogeeni, ½ mahust 7,5 M ammooniumatsetaati  $\text{NH}_4\text{Ac}$ , 3X mahtu 96% etanooli ning asetati 10 minutiks -80 °C juurde. Seejärel sadestati DNA tsentrifuugimisega 15 minutit maksimumpööretel +4 °C juures, aspireeriti supernatant ning sadenenud plasmidi pesti 1 ml 70% etanooliga. Järgnevalt tsentrifuugiti DNA-d 10 minutit maksimumpööretel ning peale supernatandi aspireerimist kuivatati termostaadis 37 °C juures. DNA lahustati TE puhvrts ja kasutati edaspidistes reaktsioonides.

### 2.2.2.3 Kodeeriva ala ning terminaatorjärjestuse amplifitseerimine genoomselt DNA-lt

Metsiktüüpi plasmidi konstrueerimiseks on vajalik viia plasmidi promootor koos kodeeriva alaga ning seejärel terminaatorjärjestus. Põhjuseks on plasmidis sisalduv epitoop, mis jääb kodeeriva ala ning terminaatorjärjestuse vahele ning selektsiooni marker mis jääb epitoobi ja terminaatorala vahele. Amplifitseerimiseks kasutatud PCR praimerid on toodud tabelis 1, PCR lahus ja programm on toodud tabelis 2. Produktid lahutati geelelektroforeesil, korrektne produkt identifitseeriti UV valgusega (322nm) ning lõigati geelist välja ja puhastati kasutades geelist puhastamise komplekti (Favorgen *FavorPrep GEL/PCR Purification Kit*), järgides tootjapoolseid juhiseid. Amplifitseeritud järjestused on praimeriks järgmistes katsete etappides (Joonis 11 B).

**Tabel 1 *Fkh1* segmentide amplifitseerimiseks kasutatud praimerid**

Prom+ ORF F	GTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGACGTTGTAAAACG ACAAGGTCATGTCCAGGTAGAC
Prom+ ORF R	GTGAACCGCCCCTCTAGAGCGGCCGCCACCGCGGTGGAGACTC AGAGAGGAATTGTTACG
Fkh1 term F	GTTATCCGCTCACAATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGAATT CAGCGTCGTCGAAC
Fkh1 term R	TTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAAGTT CTGTACAGCGTCTTC

**Tabel 2 PCR protokoll *Fkh1* järjestuste amplifitseerimiseks.**

Maht 50 µl	Lõpp-kontsentratsioon	Tsükliid	°C	Aeg
DNA (genoomne)	5 ng	Denaturatsioon	98	1 min
Praimer R	0,3 qmol	Denaturatsioon 2	98	20 sek
Praimer F	0,3 qmol	Praimerite seondumine	60	30 sek
dNTP	0,2 mM	DNA süntees	68	3.30 min
MgCl <sub>2</sub>	0,5 mM	Lõplik süntees	68	7 min
DMSO	6%			
<i>Phusion</i> HF puhver 5X	1X			
<i>Phusion</i> polümeraas	1U			
H <sub>2</sub> O	lõppmahuni			

#### 2.2.2.4 Geelelektroforees

PCR produktid lahutati ja visualiseeriti geelelektroforeesiga. Töös kasutati 0,8-1% agarose geele (50 ml 1X TAE puhver, agarospulber 8 g/l). Produktide suuruse hindamiseks lisati geelile ka vastavalt vajadusele kas 100bp (*Thermo Fisher*) ja/või 1000bp (*Thermo Fisher*) redel. Järgnevalt lahutati DNA fragmendid elektriväljas rakendades toiteallikaga (*Bio-Rad Gel Electrophoresis Sub-Cell GT, Power Supply PowerPac™ Basic*) elektripinget 120V. Tulemused visualiseeriti UV valguse all ning vajadusel jäädvustati *BioSpectrum 510 Imaging System* UV masinaga.

#### 2.2.2.5 *Fkh1* segmentide sisestamine plasmidi overlap PCR-iga

Kloneerimiseks kasutati *Overlap* PCR meetodit (Täpsemalt lisas 1) (Bryksin ja Matsumura, 2010), mille eeliseks traditsioonilise "sünteesi, restrikteeri ja ligeeri" meetodi ees on, et plasmidi saab sisestada ükskõik millise järjestuse ja samuti saab ükskõik millise järjestuse plasmidist eemaldada kasutades selleks ainult PCR reaktsiooni. Seega overlap PCR on kergemini omastatav tehnikaga kuna ei ole vaja restriksiooni saite sobitada. See meetod nõuab keskmiselt 60 aluspaari pikkuseid praimereid (Tabel 1).

Oma 3'otsaga seonduvad need praimerid ~20 nukleotiidi pikkuselt genoomse DNA-ga, et amplifitseerida meid huvitav järjestus. 5'otsad genoomse DNA-ga ei paardu ja on disainitud käitumaks praimerina plasmidi peal. Selliselt disainitud praimeritega amplifitseeriti *Fkh1* segmendid (punktis 4.2.2.3) mis sisestati pBS-3x3F12-NATMX6 plasmidi PCR-iga. Esialgne programm on toodud tabelis 3, optimeeritud protokollid *Fkh1* kodeeriva osa ja terminaator piirkonna sisestamiseks on toodud tabelis 4.

Järgnevalt degradeeriti matriits DNA suspensioonist kasutades *DpnI* töötlust (4.2.2.6). Saadud produkt lahutati geelelektroforeesiga, ja puhastati *FavorPrep GEL/PCR Purification Kit* komplektiga. Puhastatud produkt transformeeriti (2.2.2.7) *DH5α E. Coli* kompetentsetesse rakkudesse, kasvatati 15 tundi (100ug/ml) penitsilliini sisaldaval LB tardsöötmel 37 °C juures. Kolooniatest kontrolliti *Fkh1* plasmidi sisestamist PCR-ga ja tulemust analüüsiti geelelektroforeesil. (Bryksin ja Matsumura, 2010)

**Tabel 3 *Overlap* PCR protokoll Fkh1 inserdi sisestamiseks plasmidi (Bryksin ja Matsumura, 2011)**

Maht 100 µl	Lõpp-kontsentratsioon	Tüklid	°C	Aeg
Vektor DNA	30 ng	Denaturatsioon	100	1 min
Fkh1 insert	ng ei ole täpsustatud	Denaturatsioon 2	95	50 sek
dNTP	0,2 mM	Praimerite seondumine		
MgCl <sub>2</sub>	-	DNA süntees		
DMSO	2%	Lõplik süntees	68	12 min
<i>Phusion</i> HF puhver	1X			
5X				
<i>Phusion</i> polümeraas	1U			
H <sub>2</sub> O	lõppmahuni			

**Tabel 4 *Overlap* PCR protokoll ORF ja TERM sisestamiseks plasmidi**

Maht 100 µl	Lõpp-kontsentratsioon	Tüklid	°C	Aeg
DNA (plasmid NAT pBS-3x3F12-NATMX6)	10 ng	Denaturatsioon	99	1 min
Insert DNA	900 ng	Denaturatsioon 2	95	50 sek
dNTP	0,2 mM	Praimerite seondumine		
MgCl <sub>2</sub>	0,5 mM	DNA süntees		
DMSO	6%	Lõplik süntees	68	15 min
<i>Phusion</i> HF puhver 5X	1X			
<i>Phusion</i> polümeraas	1 U			
H <sub>2</sub> O	lõppmahuni			

#### 2.2.2.6 DPN töötlus overlap PCR-ile

Enne transformeerimisi on vajalik vana plasmidi degradeerimine kindlustamiseks, et transformandid sisaldavad muteeritud plasmidi. Selleks kasutati restriktasi DpnI. DpnI on II tüüpi restriktas, mis tunneb ära *E.colis* metüleeritud adeniini GATC järjestuses, ning lõikab bakteriaalselt DNA-d äratundmiskohast jättes PCRiga amplifitseeritud DNA terveks. (Gomez-Eichelmann ja Lark, 1977).

Eelnevalt sadestatud ja TE-s lahustatud DNA-le lisati 1/10 mahust Tango puhvrit (*Fermentas Tango 10X buffer*) ning DpnI restriктаasi (*Thermo Scientific*). Inkubeeriti termostaadil üleöö 37 °C juures.

#### **2.2.2.7 Plasmidi transformeerimine *E. Coli* rakkudesse**

Soovitud plasmidi amplifitseerimiseks transformeeriti soovitud produkt kompetentsetesse *E. Coli* DH5α liini rakkudesse. Külmikust (-80 °C) tõsteti rakud koheselt jääle, säilitamaks nende kompetentsust. Transformeerimise jaoks asetati uued 1,5 ml tuubid jääle ning iga transformatsiooni jaoks tõsteti 40 µl eelnevalt õrnalt suspendeeritud rakke jääkülma tuubi. Transformeeritavat DNA-d lisati 50-100 ng ning segati õrnalt suspendeerides. Rakke inkubeeriti 30 minutit jääl. Peale 30 sekundilist kuumašhokki 42 °C juures asetati tuubid uuesti 3 minutiks jääle. Järgnevalt lisati rakkudele eelsoojendatud 37 °C SOC söödet ning inkubeeriti 60 minutit termostaadis 37 °C ja 500 rpm juures. Peale inkubeerimist plaaditi rakud penitsilliini sisaldavatele LB tassidele ning kasvatati üleöö 37 °C-l.

#### **2.2.2.8 Plasmidse DNA puhastamine bakterist**

Kolooniate kontrollimiseks puhastati plasmidne DNA bakterist kasutades lüüsi ja neutralisatsioonipuhvreid (Lisa 4). Esmalt lüüsi üks koloonia 1,5 ml tuubis 100 µl P2 lüüsipuhvris õrnalt suspendeerides, järgnevalt lisati 150 µl P3 neutralisatsioonipuhvrit ning segati tuubi sisu paar korda keerates. Lüsaati tsentrifuugiti 10 minutit maksimumkiirusel, ning tõsteti plasmidi sisaldav supernatant uude 1,5 ml tuubi DNA sadestamiseks. Selleks lisati segule 3 mahtu 96% etanooli, ning asetati tuubid kümneks minutiks -80 °C külmkappi. Järgnevalt tsentrifuugiti DNA-d sadestamiseks 10 minutit maksimumpööretel +4 °C juures. Supernatant aspireeriti ja sadestatud DNA-d kuivatati 37 °C termostaadil 10 minutit. Edaspidiseks kasutamiseks suspendeeriti DNA 50 µl TE-s.

Sekveneerimisele mineva plasmidi saamiseks kasvatati PCR-iga kontrollitud transformante 50 ml LB vedelsöötmes koos ampenitsilliiniga (100 µg/ml) ning plasmid eraldati *NucleoBond Xtra Midi (Macherey-Nagel)* komplekti kasutades järgides tootja juhiseid.

#### **2.2.3 Deletsioonimutantide konstrueerimine**

Deletsioonid viidi sisse overlap PCR reaktsiooniga (Tabel 5) kasutades vastavaid praimereid (Lisa 5). Kokku tehti 7 plasmidi, mis sisaldasid kõik ühte teistest erinevat deletsiooni (Joonis 5). Peale deleteerimist puhastati DNA PCR segust sadestamisega, viidi läbi DpnI töötlus ning

geelektroforees. Järgnevalt transformeeriti deletsiooni sisaldav plasmiid kompetentsetesse rakkudesse.

### 2.2.3.1 Plasmiidide kontrollimine

Kõiki *Overlap* PCR kloneerimise produkte ning deletsiooniga plasmide kontrolliti *E. Coli* transformantidest eraldatud DNA-lt kasutades PCR praimereid ning *Firepol* 5X polümeraasi ja reaktsioonipuhvri segu (Tabel 6). Tulemusi analüüsiti geelektroforeesil.

Deletsioonide kontrollimiseks puhastati igalt transformatsiooni tassilt 5-10 kolooniat ning kontrolliti PCR praimeritega (Lisa 6). Lisaks tehti kontrolliks PCR samade praimeritega ka WT plasmiidiga. PCR tulemust analüüsiti geelektroforeesil, kandes geelile nii 1 kb ja 100 mb redeli ning WT kontrolli.

**Tabel 5 PCR protokoll deletsioonide sisestamiseks WT plasmidi**

Maht 50 µl	Lõpp-kontsentratsioon	Tüklid	°C	Aeg
DNA (plasmiidWT)	60 ng	Denaturatsioon	99	1 min
Praimer Fkh1 Del F	0,3 qmol	Denaturatsioon 2	95	25 sek
Praimer Fkh1 Del R	0,3 qmol	Praimerite seondumine	20 58*	40 sek
dNTP	0,2 mM	DNA süntees	68	12 min
MgCl <sub>2</sub>	0,5 mM	Lõplik süntees	68	15 min
DMSO	6%			
<i>Phusion</i> HF puhver 5X	1X			
<i>Phusion</i> polümeraas	1U			
H <sub>2</sub> O	lõppmahuni			

\*Deletsioon 3 seondumistemperatuur: 61° C



**Tabel 6 PCR produktide kontrollimise protokoll**

Maht 10 µl	Lõpp-kontsentratsioon	Tüklid	°C	Aeg
Kontrollitav DNA	~30 ng	Denaturatsioon	95	3 min
Praimer F	0,3 qmol	Denaturatsioon 2	95	30 sek
Praimer R	0,3 qmol	Praimerite seondumine	30 54	54 sek
<i>Firepol 5X</i>	1X	DNA süntees	72	5 min
reaktsioonipuhvri				
segu				
H <sub>2</sub> O	lõppmahuni	Lõplik süntees	72	8 min

#### 2.2.4 Sekveneerimine

Sangeri sekveneerimisega kontrolliti WT plasmiid ning kõiki deletsiooniga plasmiide. Sekveneerimisel kasutatavad praimerid on toodud lisas 7. Teenuse osutajaks oli EBK DNA sekveneerimise tuumiklabor.

#### 2.2.5 Deletsiooniga ala amplifitseerimine pärmi transformeerimise jaoks

Deletsioon sisaldav ala amplifitseeriti PCR parimeritega (Tabel 7). Protokoll on toodud tabelis 8. Amplifitseeritud ala kasutatakse edaspidi pärmi transformeerimisel, kus see lülitab homoloogilise rekombinatsiooni alusel järjestuse oma genoomi.

**Tabel 7. Deletsiooni sisaldava ala üles ampifitseerimiseks kasutatavad praimerid**

Fkh1 TR_F	ATAGAGAGAACAGGATGGTAAGAG
Fkh1 Term R	TTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAA <b>GTT</b> <b>CTGTCACAGCGTCTTC</b>

**Tabel 8 PCR protokoll deletsiooni sisaldava ala ampifitseerimiseks**

Maht 50 µl	Lõpp-kontsentratsioon	Tüklid	°C	Aeg
DNA (Del. plasmiid)	~4 ng	Denaturatsioon	99	1 min
Praimer Fkh1 TR_F	0,3 qmol	Denaturatsioon 2	95	25 sek
Praimer Fkh1 Term R	0,3 qmol	Praimerite seondumine	30 58	40 sek
dNTP	0,2 mM	DNA süntees	68	12 min
MgCl <sub>2</sub>	0,5 mM	Lõplik süntees	68	15 min
DMSO	6%			
Phusion HF puhver 5X	1X			
Phusion polümeraas	1U			
H <sub>2</sub> O	lõppmahuni			

## 2.3 Tulemused ja arutelu

Replikatsiooni ajastuse kontrollimise olulisusele viitab nelja pärmi sugulasliigi replikatsiooni uuring (*Saccharomyces cerevisiae*, *S. paradoxus*, *S. arboricolus*, and *S. bayanus*), kus näidati nende liikide varajaste originite tugevat konserveerumist (Müller & ja Nieduszynski, 2012). Replikatsiooni ajastuse kontrolli eesmärk on ilmselt genoomi replitseerimine S faasi jooksul täpselt üks kord ning seda, kohasuse aspektist, optimaalse ajaga. Originite aktivatsiooni kontrolli häirumine põhjustab kromosoomi aberratsioone, mis omakorda võib põhjustada kontrolli alt väljunud rakujagunemist.

Eukarüootidel on tulenevalt nende suurest genoomist välja kujunenud süsteem, mille järgi alustatakse genoomi replitseerimist paljudelt *originidelt*. Regulatsiooni tekitamiseks kasutatakse ära fakti, et replikatsioonil osalevad valgud on rakkudes limiteeritud hulgal, mis tähendab, et replikatsiooniks vajalikke valke ei jagu kõikidele originidele korraga ja replikatsioon ei saa alata kõigilt *originidelt* korraga. Kromosoomi lookustel, mille replikatsioon peab toimuma varem, paiknevad originid millel on hõlpsam ligipääs limiteerivatele faktoritele. Esimeste originite termineerumisel vabanevad limiteerivad faktorid Cdc45 jt ning need värvatakse hilistele originidele, mis saavad seejärel aktiveeruda. Selliselt tagatakse originite aktiveerumise ajaline kord. Millised valgud ja kuidas seda korda tagavad ei ole siiani päris selge.

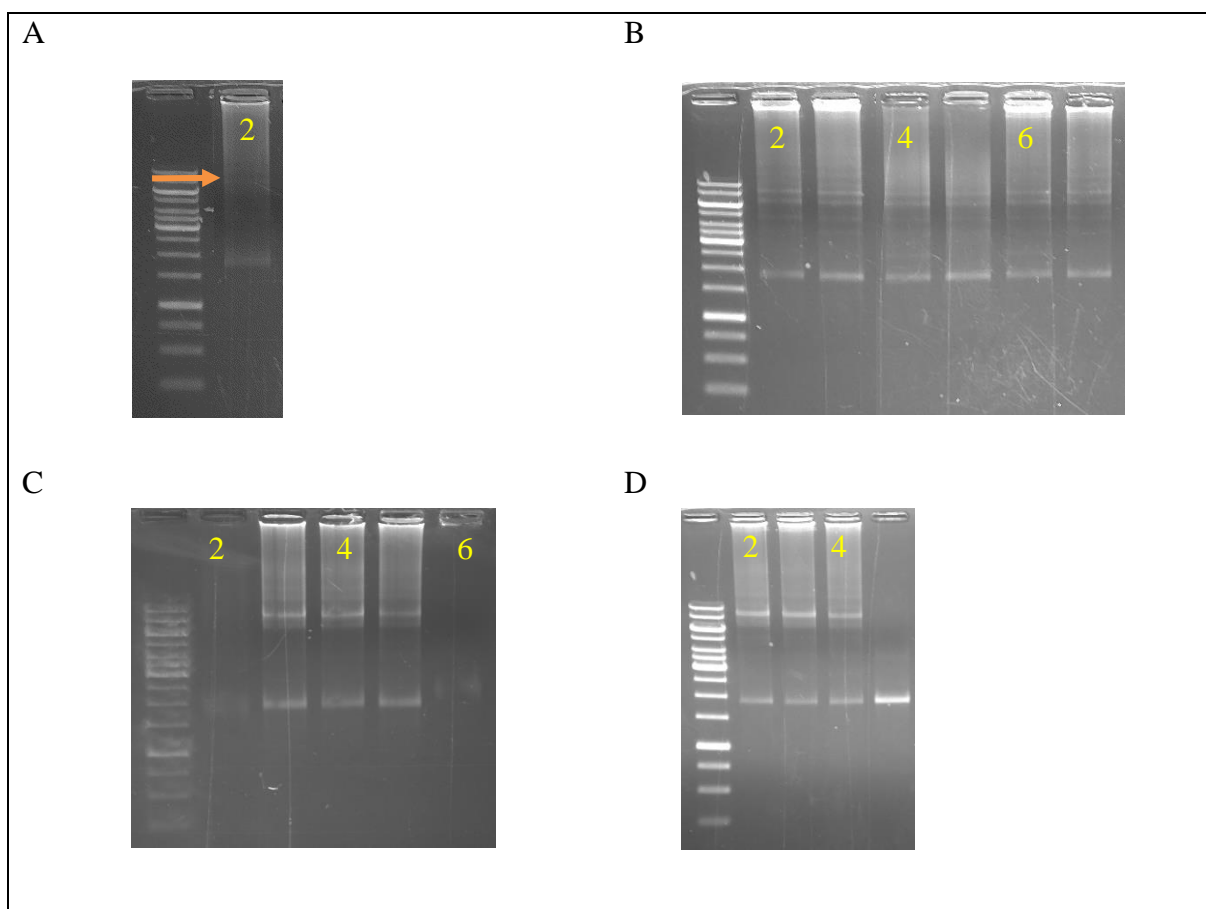
Hiljuti on leitud kaks valku, mis mõjutavad originite aktiveerimise ajastust üle kogu genoomi, kuid siiski iga lookuset erineva suunaga, varasemaks või hilisemaks. Efekt replikatsiooni *originide* ajastusele on pretsedenditu. Nendeks valkudeks on Fkh1 ja Rif (*Telomere-associated protein*). Rif-i poolset regulatsioonimehhanismi defineeriti ligi pool aastat tagasi (Hiraga et al., 2014), kuid Fkh1/2 poolne mehhanism on ebaselge.

Meie töögrupi üheks suunaks on iseloomustada Fkh1 transkriptsioonifaktorit, mis omab mõju varaselt ja hiliselt replitseeruvate *originide* regulatsioonis. Pole teada, millised Fkh1 alad on selleks replikatsioonis avalduvaks rolliks vajalikud ning esimene etapp selle välja selgitamiseks oligi antud töö käigus tehtud deletsiooniplasmiidide konstrueerimine.

### 2.3.1 Overlap PCR protokoll optimeerimine

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärkide saavutamiseks valiti deletsioonimutantide konstrueerimiseks *overlap PCR* meetod, kuna tegemist on lihtsa ja usaldusväärse meetodiga. Uurimisgrupil oli selle meetodiga töötamise kogemus olemas, kuid seda võrdlemisi lühikeste segmentidega (300bp) manipuleerimisel. Seega sooviti leida sobivad tingimused pikemate

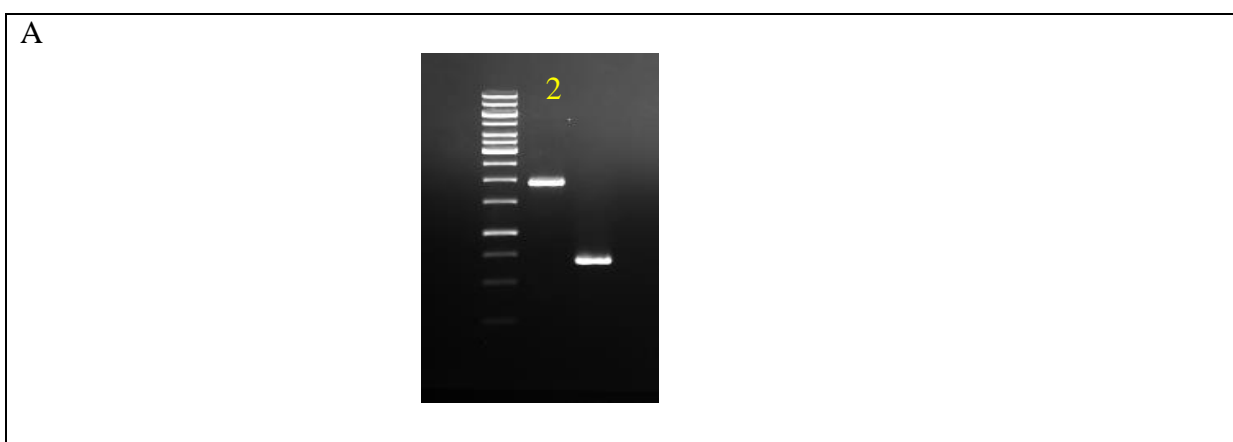
fragmentide sisestamiseks plasmidi, et seda protokolliga tulevikus kasutada plasmiidide valmistamiseks. Käesolevas töös deletsiooni mutantide tegemisel osutus vajalikuks sisestada ~1800 aluspaari pikkune segment plasmidi. See fragment sünteesitakse genoomse DNA pealt. Saadud kaheaahelaline produkt peab käituma praimerina plasmidi peal (meetodi printsiip on toodud lisas 1). Artiklis toodud protokolliga kasutades oli aga *overlap PCR*-i efektiivsus madal nagu võib näha jooniselt 7 A, sünteesitud produkt ei olnud geelil märgatav (Bryksin ja Matsumura, 2010). Tõenäoliselt tekkis siin probleem 1800 bp pikkuse kaheaahelalise praimeriga, kuna paardumiseks 3' otsaga peab praimer lahti sulama, kuid pikemad fragmendid vajavad selleks kõrgemat temperatuuri, lisaks kasutatud *Phusion* polümeraas stabiliseerib kaheaahelalist DNA-d. Optimaalse protokolliga leidmiseks katsetati erinevaid PCR-i tsükli arve (Joonis 7 B),  $MgCl_2$  (Joonis 7 C) ning DMSO (Joonis 7 D) kontsentratsioone. PCR reaktsioon töötas kõige paremini 20 tsükli; 0,5 mM  $MgCl_2$  ja 6% DMSO kontsentratsiooniga korral. Lõplik PCR protokoll on toodud tabelis 4. Järgnevalt oli võimalik alustada plasmidi konstrueerimist, mis sisaldas *FkhI* Promootor- kodeerivat ala ning peale epitoopi ka *FkhI* terminaator ala.



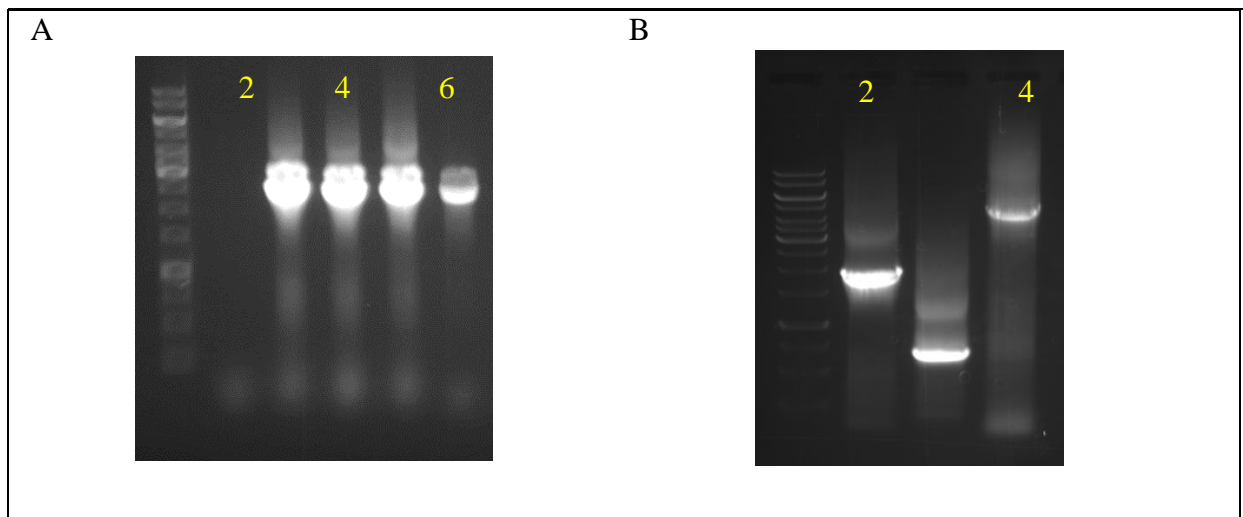
**Joonis 7 *Overlap* PCR-i optimeerimine** Joonistel esimese raja peal 1Kb redel. **A)** Avaldatud protokoll (Bryksin & Matsumura, 2013) järgi tehtud *overlap* PCR ja produkt lahutatud agarose geleelektroforeesiga. Oodatav produkti suurus on markeeritud noolega. **B)** Järgitud sama protokoll mis sektsioonis A, kuid varieeriti PCR-i tsüklite arvu (rada – 20 tsükli; rada 3 – 21 tsükli; rada 4 – 22 tsükli). Edasised optimeerimised teostati 20 tsükliga. **C)** Arvestades sektsiooni B tulemusi optimeeriti MgCl<sub>2</sub> kontsentratsiooni (rada 2 – 0,15mM; rada 3 – 0,5mM; rada 4 – 0,8mM; rada 5 – 1mM; rada 6 – 5mM). Sobivamaiks osutus 0,5mM MgCl<sub>2</sub>. **D)** Lisades esialgsele protokollile tulemusid B ja C sektsioonist optimeeriti DMSO hulka PCR reaktsioonis (rada 2 – 2%, rada 3 - 6%; rada 4 – 12%; rada 5 - 22%). Parima tulemuse andis 6% DMSO maht.

### 2.3.2 Metsiktüüpi plasmidi konstrueerimine

Metsik-tüüpi *FkhI*-te sisaldava plasmidi konstrueerimiseks amplifitseeriti pagaripärmi genoomselt DNA-lt *FkhI* kodeeriv osa koos promootoralaga ning samuti amplifitseeriti *FkhI* terminaator ala (Joonis 8). Eeltoodud järjestused sisestati *overlap* PCR- i meetodit (Bryksin ja Matsumura, 2010) kasutades pBS-3x3F12-NATMX6 plasmidi, mis sisaldas planeeritavate katsete jaoks sobivat epitoopi 3x3F12 ja marker geeni NAT. Esimesena inserteeriti *FkhI* kodeeriv osa koos promootoralaga, transformeeriti *E.colisse*. Kolooniad kontrolliti PCR-iga (Joonis 9 A) ja valitud positiivsete kolooniatest eraldati plasmid ning kontrolliti sekveneerimisega. Olles kindel kodeeriva osa korrektses inserteerumises sisestati sama printsiibi alusel ka terminaator ala plasmidi, allavoolu epitoobi järjestusest. Kogu konstrukti huvi pakkuv ala kontrolliti PCR-i (Joonis 9 B) ja sekveneerimisega. Järgnevalt hakati deleteerima ükshaaval *FkhI* kodeerivast alast erinevaid segmente.



**Joonis 8** Pagaripärmi genoomse DNA pealt (rada 2) *FkhI* promootor ja kodeeriva ala amplifitseerimine ning (rada 3) terminaatorpiirkonna amplifitseerimine

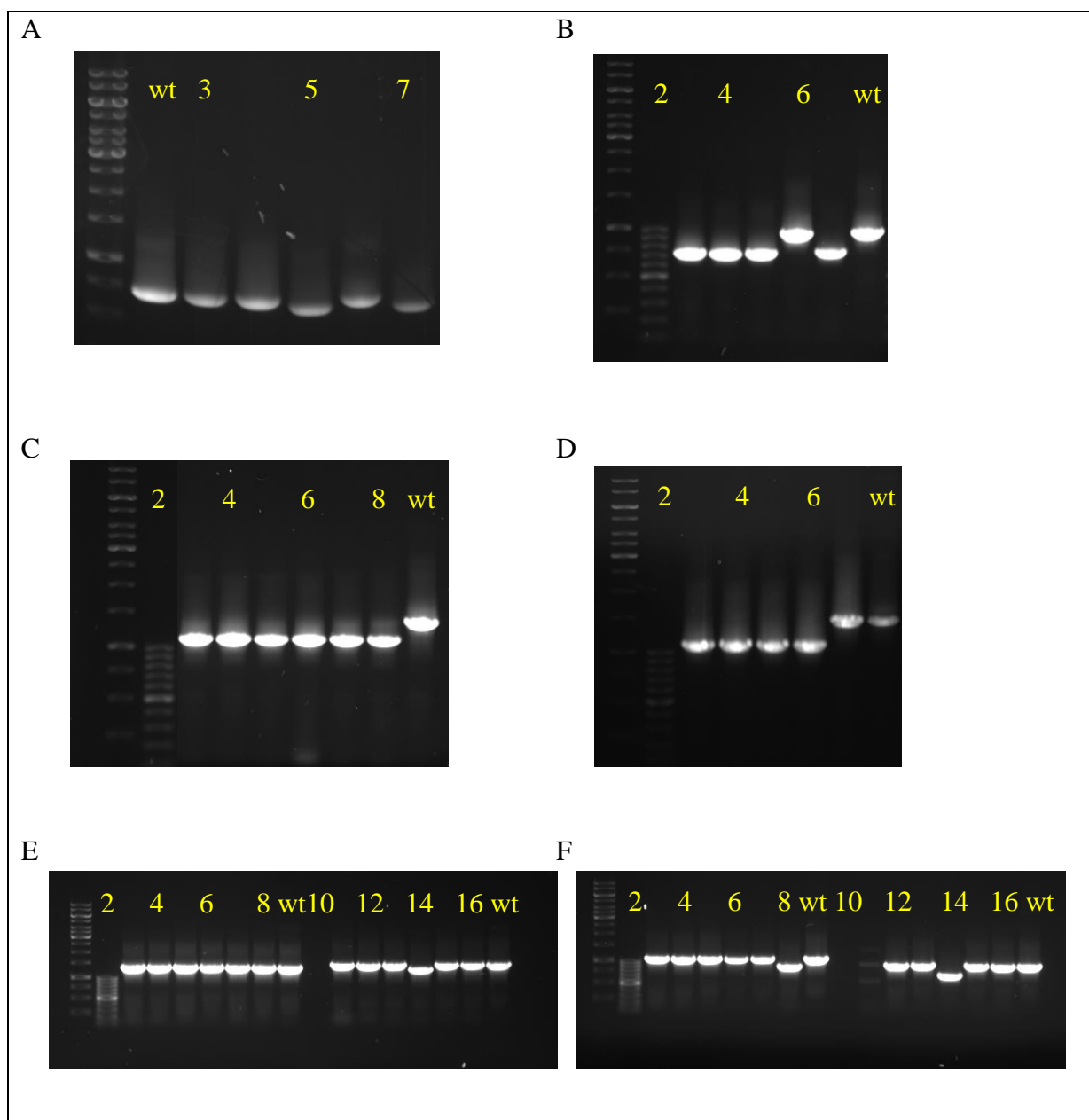


**Joonis 9 Metsiktüüpi plasmidi Fkh1 kodeeriva ala ja terminaatorala inserteerumise kontroll.**

**A)** PCR kontrollimaks *Fkh1* promootor ning kodeeriva ala inserteerumist. Kasutati *E.colist* eraldatud plasmidi ning praimereid mille *forward* primer seondub originaal plasmidi osa peale ning *reverse* praimer seondub inserteeritud osa peale. Rada 2 on valepositiivne koloonia ning rada 3;4;5;6 sisaldavad on muteeritud plasmiidid. **B)** Kontrolliti valmis plasmidi PCR-iga. Rada 2 - praimerid seonduvad *Fkh1* promootor alale ja kodeerivale alale. Rada 3- praimerid seonduvad terminaator alale ja kodeerivale alale. Rada 4- praimerid seonduvad *Fkh1* promootoralale ning terminaator alale.

### 2.3.3 Deletsioonimutantide konstrueerimine

Deletsioonimutandid konstrueeriti metsik-tüüpi plasmidi peal. Selleks kasutati *overlap* PCR-i ja deleteerimiseks spetsiaalselt disainitud praimereid. *Overlap* PCR-i produkt transformeeriti *E.colisse* ning külvati selektiivtassile. Saadud kolooniaid kontrolliti PCR-iga. Deletsiooni toimumist kinnitas PCR-il sünteesitud lühem produkt võrreldes metsiktüüpi plasmiidiga. (Joonis 10 A – F). Positiivseteks osutunud kolooniatest eraldatud plasmiidide korrektsust kontrolliti sekveneerimisega.



**Joonis 10 Fkh1 segmentide deletsiooni kontrollimine.** Deletsiooni kontrolliti PCR vahendusel. Metsiktüüpi kontrollist lühem produkt tähendab deletsiooni toimumist. **A)** Del I, muteerunud plasmiid on rajal 5 ja 7. **B)** Del II, muteerunud plasmiid on rajal 3-5; 7. **C)** Del III, muteerunud plasmiid on rajal 3-8. **D)** Del IV, muteerunud plasmiid on rajal 3-6. **E)** Del V, muteerunud plasmiid on rajal 14. **F)** Del VI, muteerunud plasmiid on rajal 8. Del VII, muteerunud plasmiid on rajal 14.

## KOKKUVÕTE

DNA replikatsiooni eesmärk on anda rakkude jagunemisel tütarrakkudele edasi genoomi terviklik vigadeta koopia. Eukarüootidel on üheks mehhanismiks selle tagamisel *originide* erinev replitseerumise ajastus, et kindlustada mahuka genoomi replitseerimine rakutsükli S-faasi jooksul. Sedavõrd tähtis mehhanism on kontrollitud mitmete epigeneetiliste modifikatsioonidega, mis hõlmavad nii kromosoomi erinevaid struktuure, kromosoomide asetust tuumas ning valkude ligipääsetavust *originidele*.

Hiljuti näidati kahe globaalse *Forkhead* transkriptsioonifaktori Fkh1 ja Fkh2 osalust *originide* aktivatsiooni regulatsioonis. Katsed deletsioonimutatantidega on näidanud, et mõlema valgu deleteerimine muutis oluliselt *originide* ajastust ning suuremat rolli mängis Fkh1 deleteerimine. Fkh1 osaleb just varaste *originide* selektsioonis.

Kuna tegu on hiljutise avastusega, on teadmised Fkh1 ja Fkh2 transkriptsioonifaktorite rollist replikatsioonis puudulikud. Antud töö eesmärk oligi edaspidiseks Fkh1 iseloomustamiseks selle geeni kodeeriva ala deletsioonimutantide konstrueerimine. Selleks konstrueeriti metsiktüüpi plasmid, kuhu esmalt viidi *overlap* PCR meetodil sisse Fkh1 kodeeriv ala koos promootoriga ning seejärel sisestati samal meetodil terminaatorjärjestus. Valmistatud metsiktüüpi plasmidi põhjal konstrueeriti seitse erinevat deletsiooniga plasmidi, millelt amplifitseeriti promootor – ja terminaator ala edaspidiseks pagaripärmi transformeerimiseks.

Töö edasine kulg näeb ette amplifitseeritud deletsioonialade transformeerimist pärmi, kus see inserteerub homoloogilise rekombinatsiooni alusel pärmi genoomi. Seejärel hinnatakse Fkh1 segmentide deletsiooni mõju replikatsiooni ajastusele individuaalsetel originitel. Selleks vaadeldakse kõige varasemate teadaolevate Fkh1/2 poolt reguleeritud originite ajastuse muutust, olukorras kus teatud osa Fkh1 kodeerivast osast on delegeeritud. Seda plaanitakse iseloomustada kasutades koopiaarvu muutuse analüüsi. Kui nihe aktivatsiooni ajastuses on tuvastatud, kasutatakse muutuse statistiliseks näitamiseks kromatiini immuunosadestamist ChiP (*Chromatin Immunoprecipitation*).



## **Construction of deletion plasmids of Forkhead 1 transcription factor coding gene**

### **SUMMARY**

Kairi Koppel

The purpose of DNA replication is to provide a complete error - free copy of genome to daughter cells during cell division. One mechanism ensuring that is distributing origins activation time evenly across the S phase. This characteristic of eukaryotic genome replication is controlled mainly by limiting the access of replication proteins to replication origins.

Recently, it was shown that two global transcription factors Fkh1 and Fkh2 play an important role in regulating access to replication proteins. Experiments with deletion mutants showed that deletion of both proteins shifted the timing of origins and deletion of Fkh1 played the greatest role.

Fkh1 participates in selection of early origins. Since this is a recent discovery, mechanism by which Fkh1/2 manipulates replication timing is unknown. The aim of this work was to construct a series of deletion plasmids by deleting selected areas in Fkh1 coding gene. These plasmids could be used to describe Fkh1 role in future work. To achieve this, wild- type plasmid was constructed and by using an Overlap PCR method, coding region with promoter was inserted. Next, by using same method, terminator sequence was inserted. Based on wild-type plasmid, seven different deletion plasmids were constructed and for future work, promoter – terminator area was amplified in PCR reaction

Future course of this work will provide conducting transformation of amplified deletion area to *Saccharomyces Cerevisiae* where it inserts into the genome by homologous recombination. By that, the impact of deletions of Fkh1 segments to replication timing on individual origins can be measured by observing replication timing shift in known Fkh1/2 earliest regulated origins. This is going to be characterized by using a copy number analysis. If the shift in replication origin firing time is detected, ChiP Chromatin Immunoprecipitation is used to show statistical significance of this shift, since copy number analysis may not produce great error bars.

## **TÄNUAVALDUSED**

Sooviksin tänada kõiki, kes aitasid selle lõputöö valmimisele kaasa, eelkõige oma juhendajat Allan Reinapaed kasulike nõuannete ja juhendamise eest.

## KASUTATUD KIRJANDUSE LOETELU

- Aparicio, O. M., Weinstein, D. M., Bell, S. P. (1997). Components and dynamics of DNA replication complexes in *S. cerevisiae*: Redistribution of MCM proteins and Cdc45p during S phase. *Cell*. 91:59–69.
- Araki, H. (2010). Regulatory mechanism of the initiation step of DNA replication by CDK in budding yeast. *Biochim Biophys Acta* 1804: 520–523.
- Bell, S. P., Mitchell, J., Leber, J., Kobayashi, R., Stillman, B. (1995). The multidomain structure of Orc1p reveals similarity to regulators of DNA replication and transcriptional silencing. *Cell* 83: 563–8.
- Bell, S. P., Stillman, B. (1992). ATP-dependent recognition of eukaryotic origins of DNA replication by a multiprotein complex. *Nature*. 357:128–34.
- Bell, S. P., Stillman, B. (1992). ATP-dependent recognition of eukaryotic origins of DNA replication by a multiprotein complex. *Nature* 357: 128–34.
- Belsky, J. A., MacAlpine, H. K., Lubelsky, Y., Hartemink, A. J., MacAlpine, D. M. (2015). Genome-wide chromatin footprinting reveals changes in replication origin architecture induced by pre-RC assembly. *Genes Dev.* 2015 Jan 15;29(2):212-24.
- Berezney, R., Dubey, D. D., Huberman, J. A. (2000). Heterogeneity of eukaryotic replicons, replicon clusters, and replication foci. *Chromosoma*. Mar;108 (8):471-84.
- Berezney, R., Dubey, D. D., Huberman, J. A. (2000). Heterogeneity of eukaryotic replicons, replicon clusters, and replication foci. *Chromosoma* 108:471-484.
- Booher, R. N., Deshaies, R. J. (1993). Properties of *Saccharomyces cerevisiae* wee1 and its differential regulation of p34CDC28 in response to G1 and G2 cyclins. *Embo J.* 12(9): 3417-26.
- Bruck, I., Kaplan, D. L. (2014). The Dbf4-Cdc7 kinase promotes Mcm2-7 ring opening to allow for single-stranded DNA extrusion and helicase assembly. *J Biol Chem.* 2015 Jan 9;290(2):1210-21.
- Bryksin, A. V., Matsumura, I. (2011). Overlap extension PCR cloning: a simple and reliable way to create recombinant plasmids. *Biotechniques*. Jun; 48(6): 463–465.
- Chen, S., Bell, S. P. (2011). CDK prevents Mcm2-7 helicase loading by inhibiting Cdt1 interaction with Orc6. *Genes Dev.* 2011 Feb 15;25 (4):363-72.
- Clarey, M. G., Erzberger, J. P., Grob, P., Leschziner, A. E., Berger, J. M., Nogales, E., Botchan, M. (2006). Nucleotidedependent conformational changes in the DnaA-like core of the origin recognition complex. *Nature structural & molecular biology*. 13:684–90.
- Conti, C., Saccà, B., Herrick, J., Lalou, C., Pommier, Y., Bensimon, A. (2007). Replication fork velocities at adjacent replication origins are coordinately modified during DNA replication in human cells. *Mol. Biol. Cell* 18, 3059–3067.
- Coster, G., Frigola, J., Beuron, F., Morris, E. P., Diffley, J. F. (2014). Origin licensing requires ATP binding and hydrolysis by the MCM replicative helicase. *Mol Cell.* 2014 Sep 4;55(5):666-77.
- Dhingra, N., Bruck, I., Smith, S., Ning, B., Kaplan, D. L. (2015). Dpb11 protein helps control assembly of the Cdc45·Mcm2-7·GINS replication fork helicase. *J Biol Chem.* Mar 20;290 (12):7586-601.
- Diffley, J. F., (2004). Regulation of early events in chromosome replication. *Curr Biol.* 2004 Sep 21;14(18):R778-86.

- Diffley, J. F., (2011). Quality control in the initiation of eukaryotic DNA replication. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2011 Dec 27; 366(1584):3545-53.
- Drury, L. S., Perkins, G., Diffley, J. F. (2000). The cyclin-dependent kinase Cdc28p regulates distinct modes of Cdc6p proteolysis during the budding yeast cell cycle. *Curr Biol.* Mar 9;10 (5):231-40.
- Drury, L. S., Perkins, G., Diffley, J. F. X. (2000). The cyclin-dependent kinase Cdc28p regulates distinct modes of Cdc6p proteolysis during the budding yeast cell cycle. *Curr. Biol.* 10, 231–240.
- Eaton, M. L., Galani, K., Kang, S., Bell, S. P., MacAlpine, D. M. (2010). Conserved nucleosome positioning defines replication origins. *Genes Dev.* 24: 748–753.
- Enserink, J. M. (2011). Cell Cycle Regulation of DNA Replication in *S. Cerevisiae*. *DNA Replication-Current Advances*, Dr Herve Seligmann (Ed.), ISBN: 978-953-307-593-8.
- Enserink, J. M., Kolodner, R. D. (2010). An overview of Cdk1-controlled targets and processes. *Cell Div* 5: 11.
- Ferguson, B. M., Fangman, W. L. (1992). A position effect on the time of replication origin activation in yeast. *Cell* 68: 333–339.
- Friedman, K. L., Diller, J. D., Ferguson, B. M., Nyland, S.V., Brewer, B. J., Fangman, W. L. (1996). Multiple determinants controlling activation of yeast replication origins late in S phase. *Genes Dev.* 10: 1595–1607.
- Gambus, A., Jones, R. C., Sanchez-Diaz, A., Kanemaki, M., van Deursen, F., Edmondson, R. D., Labib, K. (2006). GINS maintains association of Cdc45 with MCM in replisome progression complexes at eukaryotic DNA replication forks. *Nat.Cell. Biol.* 8: 358–366.
- Gibson, D. G., Bell, S. P., Aparicio, O. M. (2006). Cell cycle execution point analysis of ORC function and characterization of the checkpoint response to ORC inactivation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms.* 11: 557–73.
- Gilbert, D. M. (1998). Replication origins in yeast versus metazoa: separation of the haves and the have nots. *Current opinion in genetics & development.* 8: 194–9.
- Gilbert, D. M. (2002). Replication timing and transcriptional control: beyond cause and effect. *Curr. Opin. Cell Biol.* 14: 377–383.
- Gomez-Eichelmann MC, Lark KG (1977). Endo R DpnI restriction of *Escherichia coli* DNA synthesized in vitro. Evidence that the ends of Okazaki pieces are determined by template deoxynucleotide sequence. *Mol Biol.* 1977 Dec 15;117(3):621-35.
- Göndör, A., Ohlsson, R. (2009). Replication timing and epigenetic reprogramming of gene expression: a two-way relationship? *Nat Rev Genet.* Apr;10(4):269-76.
- Goren, A., Tabib, A., Hecht, M., Cedar, H. (2008). DNA replication timing of the human  $\beta$ -globin domain is controlled by histone modification at the origin. *Genes Dev.* 22, 1319–1324.
- Müller, C. A., Nieduszynski, C. A. Conservation of replication timing reveals global and local regulation of replication origin activity. *Genome Res.* Oct;22 (10):1953-62.
- Hiratani, I., Ryba, T., Itoh, M., Yokochi, T., Schwaiger, M., Chang, C. W., Lyo, Y., Townes, T. M., Schübeler, D., Gilbert, D. M. (2008). Global reorganization of replication domains during embryonic stem cell differentiation. *PLoS Biol.* 2008 Oct 7; 6(10): e245.

- Hiraga, S., Alvino, G. M., Chang, F., Lian, H. Y., Sridhar, A., Kubota, T., Brewer, B. J., Weinreich, M., Raghuraman, M. K., Donaldson, A. D. (2014). Rif1 controls DNA replication by directing Protein Phosphatase 1 to reverse Cdc7-mediated phosphorylation of the MCM complex. *Genes Dev.* 2014 Feb 15;28(4):372-83.
- Ilves, I., Petojevic, T., Pesavento, J. J., Botchan, M. R. (2010). Activation of the MCM2-7 helicase by association with Cdc45 and GINS proteins. *Mol. Cell*, 37: 247–258.
- Jaspersen, S. L., Charles, J. F., Morgan, D. O. (1999). Inhibitory phosphorylation of the APC regulator Hct1 is controlled by the kinase Cdc28 and the phosphatase Cdc14. *Curr Biol* 9(5): 227-36.
- Jeffrey, P. D., Russo, A. A., Polyak, K., Gibbs, E., Hurwitz, J., Massagué, J., Pavletich, N. P. (1995). Mechanism of CDK activation revealed by the structure of a cyclinA-CDK2 complex. *Nature* 376 (6538): 313-20.
- Kalejta, R. F., Hamlin, J. L. (1996). Composite patterns in neutral/neutral two-dimensional gels demonstrate inefficient replication origin usage. *Mol Cell Biol.* 1996 Sep;16(9):4915-22.
- Kamimura, Y., Tak, Y. S., Sugino, A., Araki, H. (2001). Sld3, which interacts with Cdc45 (Sld4), functions for chromosomal DNA replication in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* 20: 2097–2107.
- Karamitros, D., Kotantaki, P., Lygerou, Z., Veiga-Fernandes, H., Pachnis, V., Kioussis, D., Taraviras, S. (2010). Differential geminin requirement for proliferation of thymocytes and mature T cells. *J. Immunol.* 184, 2432–2441.
- Kawakami, H., Katayama, T. (2010). DnaA, ORC, and Cdc6: similarity beyond the domains of life and diversity. *Biochemistry and cell biology*, 88:49–62.
- Kitamura, E., Blow, J. J., Tanaka, T. U. (2006). Live-cell imaging reveals replication of individual replicons in eukaryotic replication factories. *Cell* 125: 1297–1308.
- Knott, S. R. V., Peace, J. M., Ostrow, A. Z., Gan, Y., Rex, A. E., Viggiani, C. J., Tavaré, S., et al. (2012). Forkhead transcription factors establish origin timing and long-range clustering in *S. cerevisiae*. *Cell* 148: 99–111.
- Kumar R, Reynolds DM, Shevchenko A, Goldstone SD, Dalton S (2000) Forkhead transcription factors, Fkh1p and Fkh2p, collaborate with Mcm1p to control transcription required for M-phase. *Curr Biol* 10: 896–906.
- Labib, K., Diffley, J. F., Kearsey, S. E. (1999). G1-phase and B-type cyclins exclude the DNA replication factor Mcm4 from the nucleus. *Nat. Cell Biol.* 1(7): 415-22.
- Labib, K., Tercero, J. A., Diffley, J. F. X. (2000). Uninterrupted MCM2-7 function required for DNA replication fork progression. *Science.* 288: 1643–1647.
- Lalmansingh, A. S., Karmakar, S., Jin, Y., Nagaich, A. K. (2012). Multiple modes of chromatin remodeling by Forkhead box proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1819: 707–715.
- Lee, D. G., Bell, S. P. (1997). Architecture of the yeast origin recognition complex bound to origins of DNA replication. *Molecular and Cellular Biol.* 17: 7159–7168.
- Liku., M. E., Nguyen, V. Q., Rosales, A. W., Irie, K., Li, J. J. (2005). CDK phosphorylation of a novel NLS-NES module distributed between two subunits of the Mcm2-7 complex prevents chromosomal rereplication. *Mol Biol Cell* 16(10): 5026-39.
- Lin, S. and Kowalski, D. 1997. Functional equivalency and diversity of cis-acting elements among yeast replication origins. *Mol. Cell. Biol.* 17: 5473–5484.

- Lõoke, M., Kristjuhan, K., Varv, S., Kristjuhan, A. (2013). Chromatin-dependent and -independent regulation of DNA replication origin activation in budding yeast. *EMBO Rep* 2013, 14:191–198.
- Malumbres, M., Barbacid, M. (2009). Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nat Rev Cancer* 9(3): 153-66.
- Mantiero, D., Mackenzie, A., Donaldson, A., Zegerman, P. (2011). Limiting replication initiation factors execute the temporal programme of origin firing in budding yeast. *EMBO J* 30: 4805–4814.
- Marahrens, Y., Stillman, B. (1992). A yeast chromosomal origin of DNA replication defined by multiple functional elements. *Science*. 255: 817–23.
- Masai, H., Matsumoto, S., You, Z., Yoshizawa-Sugata, N., Oda, M. (2010). Eukaryotic chromosome DNA replication: where, when, and how? *Annual Review of Biochemistry* 79: 89-130.
- Mechali, M. (2010). Eukaryotic DNA replication origins: many choices for appropriate answers. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11: 728–738.
- Mimura, S., T. Seki, et al. (2004). Phosphorylation-dependent binding of mitotic cyclins to Cdc6 contributes to DNA replication control. *Nature* 431(7012): 1118-23.
- Moll, T., G. Tebb, et al. (1991). The role of phosphorylation and the CDC28 protein kinase in cell cycle-regulated nuclear import of the *S. cerevisiae* transcription factor SWI5. *Cell* 66(4): 743-58.
- Moyer, S. E., Lewis, P. W., Botchan, M. R. (2006). Isolation of the Cdc45/Mcm2-7/GINS (CMG) complex, a candidate for the eukaryotic DNA replication fork helicase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103: 10236-10241.
- Murakami, H., Aiba, H., Nakanishi, M., Murakami-Tonami, Y. (2010). Regulation of yeast forkhead transcription factors and FoxM1 by cyclin-dependent and pololike kinases. *Cell Cycle* 9: 3233–3242.
- Murray, A. W. and M. W. Kirschner (1989). Dominoes and clocks: the union of two views of the cell cycle. *Science* 246(4930): 614-21.
- Nguyen, V. Q., C. Co, et al. (2000). Clb/Cdc28 kinases promote nuclear export of the replication initiator proteins Mcm2-7. *Curr Biol* 10(4): 195-205.
- Nguyen, V. Q., C. Co, et al. (2001). Cyclin-dependent kinases prevent DNA re-replication through multiple mechanisms. *Nature* 411(6841): 1068-73.
- Nieduszynski, C. A., Knox, Y., Donaldson, A. D. (2006). Genome-wide identification of replication origins in yeast by comparative genomics. *Genes Dev.* 2006 Jul 15; 20(14):1874-9.
- On KF1, Beuron F, Frith D, Snijders AP, Morris EP, Diffley JF. (2014). Prereplicative complexes assembled in vitro support origin-dependent and independent DNA replication. *EMBO J.* 2014 Mar 18;33(6):605-20.
- Ostapenko, D., Burton, J. L., Wang, R., Solomon, M. J. (2008). Pseudosubstrate inhibition of the anaphase-promoting complex by Acml1: regulation by proteolysis and Cdc28 phosphorylation. *Mol Cell Biol* 28(15): 4653-64.
- Ostrow, A. Z., Nellimoottil, T., Knott, S. R., Fox, C. A., Tavaré, S., Aparicio, O. M. (2014). Fkh1 and Fkh2 bind multiple chromosomal elements in the *S. cerevisiae* genome with distinct specificities and cell cycle dynamics. *PLoS One*. Feb 4;9(2):e87647.

- Paveltich, N. P (1999). Mechanisms of cyclin-dependent kinase regulation: structures of Cdks, their cyclin activators, and Cip and INK4 inhibitors. *J Mol Biol.* Apr 16;287(5):821-8.
- Pavletich, N. P. (1999). Mechanisms of cyclin-dependent kinase regulation: structures of Cdks, their cyclin activators, and Cip and INK4 inhibitors. *J Mol Biol* 287(5): 821-8.
- Pines, J. (1994). The cell cycle kinases. *Semin Cancer Biol* 5(4): 305-13.
- Raghuraman MK, Brewer BJ, Fangman WL: Cell cycle-dependent establishment of a late replication program. *Science* 1997, 276:806–809.
- Rao, H., Stillman, B. (1995). The origin recognition complex interacts with a bipartite DNA binding site within yeast replicators. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92: 2224-2228.
- Remus, D. & Diffley, J. F. X. (2009). Eukaryotic DNA replication control: lock and load, then fire. *Curr. Opin. Cell Biol.* 21, 771–777.
- Remus, D., Beuron, F., Tolun, G., Griffith, J. D., Morris, E. P., Diffley, J. F. (2009). Concerted loading of Mcm2-7 double hexamers around DNA during DNA replication origin licensing. *Cell* 139: 719–730.
- Saner, N., Karschau, J. Natsume, T., Gierliński, M., Retkute, R., Hawkins, M., Nieduszynski, C. A., Blow J.J., de Moura, A. P. S., Tanaka, T. U. (2013). Stochastic association of neighboring replicons creates replication factories in budding yeast. *J Cell Biol.* 2013 Sep 30; 202(7): 1001–1012.
- Schubeler D, Scalzo D, Kooperberg C, Van Steensel B, Delrow J, Groudine M. (2002). Genome-wide DNA replication profile for *Drosophila melanogaster*: a link between transcription and replication timing. *Nat Genet* 2002, 32:438-442.
- Sheu, Y. J., Stillman, B. (2010). The Dbf4-Cdc7 kinase promotes S phase by alleviating an inhibitory activity in Mcm4. *Nature*. 2010 Jan 7; 463(7277): 113–117.
- Shirahige, K., Iwasaki, T., Rashid, M. B., Ogasawara, N., Yoshikawa, H. (1993). Location and characterization of autonomously replicating sequences from chromosome VI of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 13: 5043–5056.
- Simon, I., Barnett, J., Hannett, N., Harbison, C. T., Rinaldi, N. J., Volkert, T. L., Wyrick, J. J., Zeitlinger, J., Gifford, D. K., Jaakkola, T. S., Young, R. A. (2001). Serial regulation of transcriptional regulators in the yeast cell cycle. *Cell* 106:697-708.
- Soriano, I., Morafraila, E. C., Vázquez, E., Antequera, F., Segurado, M. (2014). Different nucleosomal architectures at early and late replicating origins in *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Genomics* 15:791.
- Stinchcomb, D. T., Struhl, K. & Davis, R. W (1979). Isolation and characterisation of a yeast chromosomal replicator. *Nature* 282, 39–43
- Zegerman, P., and Diffley, J.F. (2007). Phosphorylation of Sld2 and Sld3 by cyclin-dependent kinases promotes DNA replication in budding yeast. *Nature* 445, 281–285.
- Zhu G, Spellman PT, Volpe T, Brown PO, Botstein D, et al. (2000) Two yeast forkhead genes regulate the cell cycle and pseudohyphal growth. *Nature* 406: 90–94.
- Zou L, Stillman B. (2000). Assembly of a complex containing Cdc45p, replication protein A, and Mcm2p at replication origins controlled by S-phase cyclin-dependent kinases and Cdc7p-Dbf4p kinase. *Molecular and cellular biology.* 20:3086–96.

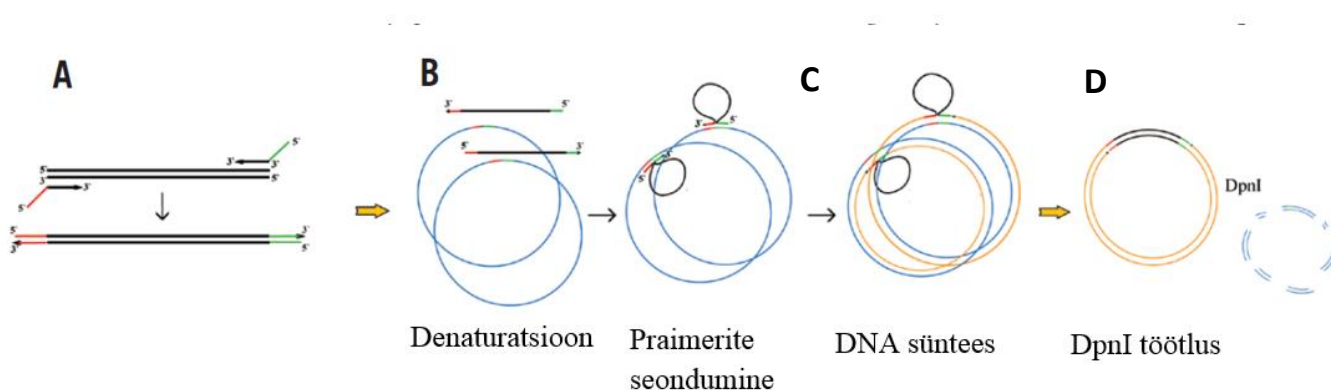
- Takara, T. J., Bell, S. P. (2011). Multiple Cdt1 molecules act at each origin to load replication-competent Mcm2-7 helicases. *The EMBO journal*. 30:4885–96.
- Tanaka, S., and Diffley, J.F.X. (2002). Interdependent nuclear accumulation of budding yeast Cdt1 and Mcm2-7 during G1 phase. *Nat. Cell Biol.* 4, 198–207.
- Tanaka, S., H. Araki (2010). Regulation of the initiation step of DNA replication by cyclin-dependent kinases. *Chromosoma* 119(6): 565-74.
- Tanaka, S., Komeda, Y., Umemori, T., Kubota, Y., Takisawa, H., Araki, H. (2010). CDK-dependent complex formation between replication proteins Dpb11, Sld2, Pol (epsilon), and GINS in budding yeast. *Genes Dev* 24(6): 602-12.
- Tanaka, S., Nakato, R., Katou, Y., Shirahige, K., Araki, H. (2011). Origin Association of Sld3, Sld7, and Cdc45 Proteins Is a Key Step for Determination of Origin-Firing Timing. *Curr Biol.* Dec 20;21(24):2055-63.
- Tanaka, S., Umemori, T., Hirai, K., Muramatsu, S., Kamimura, Y., and Araki, H. (2007). CDK-dependent phosphorylation of Sld2 and Sld3 initiates DNA replication in budding yeast. *Nature* 445, 328–332.
- Theis, J. F., Newlon, C.S. (1997). The ARS309 chromosomal replicator of *Saccharomyces cerevisiae* depends on an exceptional ARS consensus sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Sep 30;94(20):10786-91.
- Theis, J. F., Newlon, C.S. (2002). DNA replication joins the revolution: whole-genome views of DNA replication in budding yeast. *Bioessays.* Apr;24 (4):300-4.
- Theis, J.F. and Newlon, C.S. 1994. Domain B of ARS307 contains two functional elements and contributes to chromosomal replication origin function. *Mol. Cell. Biol.* 14: 7652–7659.
- Tuteja, G., Kaestner, K. H. (2007). Forkhead transcription factors II. *Cell*; 131:192.
- Tuteja, G., Kaestner, K. H. (2007). SnapShot: forkhead transcription factors I. *Cell* 130:1160.
- Walter, J. C., Araki, H. (2006) Activation of pre-replication complexes. In: DePamphilis ML (ed) DNA replication and human disease, Cold spring harbor monograph series. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, pp 89–104
- Weinreich, M., Stillmann, B. (1999). Cdc7p-Dbf4p kinase binds to chromatin during S phase and is regulated by both the APC and the RAD53 checkpoint pathway. *EMBO J.* 1999 Oct 1;18(19):5334-46.
- Weinreich, M., Palacios DeBeer, M. A., Fox, C. A. (2004). The activities of eukaryotic replication origins in chromatin. *Biochim. Biophys. Acta* 1677: 142–157.
- Wilmes G. M., Bell S. P. (2002). The B2 element of the *Saccharomyces cerevisiae* ARS1 origin of replication requires specific sequences to facilitate pre-RC formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 99:101–6.
- Vogelauer, M., Rubbi, L., Lucas, I., Brewer, B. J., Grunstein, M. (2002). Histone acetylation regulates the time of replication origin firing. *Mol. Cell* 10, 1223–1233.
- Wu, R., Terry, A. V., Singh, P. B., Gilbert, D. M. (2005). Differential subnuclear localization and replication timing of histone H3 lysine 9 methylation states. *Mol. Biol. Cell* 16, 2872–2881.
- Wäsch, R., Cross, F. R. (2002). APC-dependent proteolysis of the mitotic cyclin Clb2 is essential for mitotic exit. *Nature* 418, 556-562



Yang, S. C., Rhind, N., Bechhoefer, J. (2010). Modeling genome-wide replication kinetics reveals a mechanism for regulation of replication timing. *Mol Syst Biol.* 2010 Aug 24;6:404.

## LISAD

### LISA 1 *Overlap PCR*



**Joonis 11 *Overlap PCR*.** A. Praimerite disainimine; B. Praimerite seondumine ja DNA süntees; C. DpnI töötlus esialgse plasmidi degradeerimiseks. (Bryksin ja Matsumura, 2010)

*Phusion* polümeraas alustab *forward* praimeri pikendamist 3' otsast ning jätkab kuni matriitsahel seda võimaldab (A). Kuna disainitud praimer sisaldab 5' ülelatuvat otsa sisaldab amplifitseeritud produkt ka 5' otsas ektoopilist järjestust. Järgmises PCR tsüklis seondub juba Forward primerist moodustatud fragmendi peale *reverse* praimer ning polümeraas sünteesib forward primerist valmistatud DNA ahelast kaheahelalise DNA. Tulemusena valmib kaheahelaline DNA mis sisaldab mõlemas otsas ektoopilist DNA-d millel on vaba 3' terminus. Temperatuuri tõstes sulab kaheahelaline DNA lahti ja moodustub kaks megapraimerit (B).

Kuna ektoopilise järjestuse nukleotiidne järjekord on praimeri disainija otsus saab selle teha selliselt et see käituks praimerina näiteks plasmidi peal, mida antud töös ongi tehtud. Järgnevalt (C) seonduvad megapraimeri 3' ja 5' otsad plasmiidiga vastavalt praimeri tegija soovitud asukohtadesse. Järgnevalt hakkab polümeraas pikendama praimerit 3' otsast, sünteesib kogu plasmidi kuni polümeraas jõuab plasmiidil oleva kaheahelalise DNA-ni, mis on moodustunud algselt sünteesitud megapraimeri 5' otsa paardumisel plasmiidile. Peale sünteesi (D) degradeeritakse originaalplasmiid DpnI töötlusega ja suspensiooni jääb alles ainult muteeritud plasmiid.

Sama printsiibi alusel saab ka plasmidist elimineerida ükskõik mis järjestused, disainib praimeri mis hakkab sünteesima soovitud kohast ning plasmidist välja jääva osa saab määratleda praimeri 5' otsa paardumiskoha määratlemisega nagu on seda siin töös tehtud.

(Bryksin ja Matsumura, 2010)

**LISA 2** Kasutatud ensüümid, puhvrid, kitid, masinad ja nende tootjad

Nimetus	Tootja
<i>Pfu</i> DNA polymerase 500U	Thermo Scientific
<i>Pfu</i> 5x buffer	Thermo Scientific
<i>Phusion Green High Fidelity</i> DNA polymerase 500U	Thermo Scientific
<i>Phusion</i> 5x buffer	Thermo Scientific
<i>Firepol</i> 5X Master Mix Ready to load	Solis Biodyne
DpnI 10 U/μl	Thermo Scientific
MgCl <sub>2</sub> 50 mM	Thermo Scientific
DMSO 100%	Thermo Scientific
<i>Tango</i> 10X buffer	Fermentas
<i>FavorPrep GEL/PCR Purification Kit</i>	Favorgen
<i>FvavorPrep Plasmid Extraction Mini Kit</i>	Favorgen
<i>NucleoBond Xtra Midi Kit</i>	Macherey-Nagel
<i>GeneRuler DNA ladder 1 kb ready-to-use</i>	Thermo Scientific
<i>GeneRuler DNA ladder 1 kb ready-to-use</i>	Thermo Scientific
Agaroospulber	Lonza
<i>Centrifuge</i> 5415	Eppendorf
Gel Electrophoresis Sub-Cell GT	Bio-Rad
Power Supply PowerPac™ Basic	Bio-Rad
<i>Thermomixer compact</i>	Eppendorf
<i>Thermal Cycler 2720</i>	Applied Biosystems
BioSpectrum 510 Imaging System	UVP

**LISA 3** TE puhver 10/1

Aine	Kontsentratsioon
TRIS - HCl	10 mM
EDTA	1 mM
H <sub>2</sub> O	lõppmahuni

**LISA 4** DNA eraldamine *E. Coli* rakkudest

Aine	Lõppkontsentratsioon/maht
<b>Lüüsilahus P2, 20 ml</b>	
NaOH	0,2 M
SDS	1%
H <sub>2</sub> O	lõppmahuni
<b>Neutraliseeriv puhver P3, 30 ml</b>	
KOAc, pH 6	3 M
Äädikhape CH <sub>3</sub> COOH	3,45 ml
H <sub>2</sub> O	lõppmahuni

**LISA 2** 1X TAE puhver

Aine	Kontsentratsioon/maht
Tris- Atsetaat	0,04 M
EDTA	0,001 M EDTA
H <sub>2</sub> O	lõppmahuni

**LISA 5** Deletsioonide sisestamiseks WT plasmidi kasutatavad praimerid

Del nr	Praimerid
1	Fkh1Δ 1 R CAAGCCCTTGCATTTATTATTACTGTGTCTCTCCAAG Fkh1Δ 1 F ATAATAAATGCAAGGGCTTGTTAATGCG
2	Fkh1Δ 2 F CCAGGATCGCACAGTCGTGAAGAAGAATATAGACA Fkh1Δ 2 R TCACGACTGTGCGATCCTGGGCTGTATAC
3	Fkh1Δ 3 F TGTGCCCCGGTGAACAAGAACTATTATATCGGATTAT Fkh1Δ 3 R TTTCTTGTTACACGGGCACAGCATTC
4	Fkh1Δ 4 F TATATTGCCGGACTTGTCGCTGGATGAAAA Fkh1Δ 4 R GCGACAAGTCCGGCAATATAAAGATCATTG
5	Fkh1Δ 5 F AAATCCATCAATGGCGTGGCAGAACTC Fkh1Δ 5 R GCCACGCCATTGATGGATTTTCTATATGGGGT
6	Fkh1Δ 6 F GTTTTCTCAACAATTGCACATGTCCAAATT Fkh1Δ 6 R TGTGCAATTGTTGAGAAAACCTGTAAAATGCG
7	Fkh1Δ 7 F AAGACAGCTGCTCCACCGCGGTGG Fkh1Δ 7 R CGCGGTGGAGCAGCTGTCTTGTCACAGAGG

**LISA 6** Deletsioonide kontrollimiseks kasutatavad praimerid.

Deletsioon	Praimerid	WT pikkus	Del. mutandi pikkus
1	Fkh1 prom+ ORF F Fkh1 D3 R	402	339
2	Fkh1 prom+ ORF F Fkh1 D4 R	847	637
3	Fkh1 prom+ ORF F Fkh1 D5 R	1209	972
4	Fkh1 prom+ ORF F Fkh1 D6 R	1365	1002
5	Fkh1 D3 F FBA kntrp	716	560
6	Fkh1 D4 F FBA kntrp	1064	896
7	Fkh1 D5 F FBA kntrp	910	685

**LISA 7** Deletsioonide kontrollimiseks kasutatavad praimerid sekveneerimisel

Praimer	WT	Del 1	Del 2	Del 3	Del 4	Del 5	Del 6	Del 7
Fkh1 main F	+	+	+	+	+	+	+	+
Fkh1 D1 F				+	+			
Fkh1 D6 R			+					
Fkh1 D5 R	+	+				+	+	+
Fkh1 D4 F			+					
Fkh1 D5 F					+			
Fkh1 D3 F	+	+				+	+	+
Fkh1 D7 R				+	+			
Fba1 ctrl2	+	+	+	+	+	+	+	+
Fkh1 D2 F	+	+				+	+	+
Fkh1 term R	+	+	+	+	+	+	+	+

**Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks**

Mina \_\_\_\_\_ Kairi Koppel \_\_\_\_\_

(*autori nimi*)

(sünnikuupäev: \_\_\_\_\_ 05.05.1991 \_\_\_\_\_)

annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

***Forkhead 1* transkriptsioonifaktori kodeeriva ala deletsiooniplasmiidide  
konstrueerimine**

(*lõputöö pealkiri*)

mille juhendaja on \_\_\_\_\_ Allan Reinapae \_\_\_\_\_,

(*juhendaja nimi*)

- 1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
- 1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates **1.06.2018** kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, \_\_\_\_\_ (*kuupäev*)

